

**Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. A. Hasilik**

**Entwicklung eines Antikörper- Assays zur
Risikoabschätzung anaphylaktischer Reaktionen sowie der
Inaktivierungswahrscheinlichkeit des Enzyms L-
Asparaginase in der Therapie der akuten lymphatischen
Leukämie**

**Inaugural-Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität
Marburg
vorgelegt von**

**Josefine von Randow
aus Siegen**

Marburg, 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 17. März 2005.
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. med. Maisch
Referent:	Prof. Dr. rer. nat. Röhm
Korreferent:	Prof. Dr. med. Renz

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	L-ASPARAGINASE ALS ZYTOSTATIKUM.....	1
1.2	HISTORISCHE ENTWICKLUNG	2
1.3	STRUKTUR DER ASPARAGINASE	3
1.4	PHARMAKOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN DER ASPARAGINASEN.....	5
1.5	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	16
2	MATERIAL UND METHODEN.....	17
2.1	GERÄTE UND CHEMIKALIEN.....	17
2.2	MARKER, ENZYME UND KITS	19
2.3	VEKTOREN UND BAKTERIEN	20
2.4	COMPUTERPROGRAMME	20
2.5	HÄUFIG VERWENDETE PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN.....	20
2.6	METHODEN UND PROBENMATERIAL	21
2.7	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	23
2.8	UNTERSUCHUNGSMATERIAL.....	29
3	ERGEBNISSE	32
3.1	EXPRESSION UND CHARAKTERISIERUNG DER GST-FUSIONSPROTEINE ...	32
3.2	BESTIMMUNG VON ANTIKÖRPERTITERN GEGEN ASPARAGINASE-GST- FUSIONSPROTEINE	32
3.3	TITERBESTIMMUNGEN MIT INTAKTEN ASPARAGINASEN ALS ANTIGEN	36
3.4	„STILLE INAKTIVIERUNG“ UND TITER GEGEN ASPARAGINASEFRAGMENTE .	37
4	DISKUSSION	45
4.1	RATIONALE FÜR DIE ENTWICKLUNG EINES „EPITOP-SPEZIFISCHEN“ ASSAYS.	45
4.2	EPITOPE UND EPITOP-MAPPING	46
4.3	BRAUCHBARKEIT DES ASSAYS UND DER FRAGMENTE.....	49
4.4	EIGNUNG DER ZUR VERFÜGUNG STEHENDEN PATIENTENSEREN.....	52
4.5	KLINISCHE RELEVANZ	53
4.6	WEITERENTWICKLUNG DES „EPITOPSPEZIFISCHEN“ ASSAYS.....	55
5	ZUSAMMENFASSUNG	56
6	LITERATURVERZEICHNIS	60
7	ANHANG	67

1 Einleitung

1.1 L-Asparaginase als Zytostatikum

Ein fundamentales Therapieprinzip bei der Behandlung maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems besteht in der Unterbindung der für die Tumorzellen lebensnotwendigen Stoffwechselwege. Einen besonderen Stellenwert nimmt dabei die Aminosäure L-Asparagin ein, welche für das Wachstum bestimmter Tumorzellen essentiell ist. Durch die Depletion von L-Asparagin aus dem Serumpool wird diesen malignen Zellen ihre Lebensgrundlage entzogen. Dies kann durch die Spaltung der Aminosäure mit dem Enzym L-Asparaginase erreicht werden.

Die L-Asparaginase (EC 3.5.1.1) ist ein hydrolytisches Enzym, welches die Hydrolyse von L-Asparagin zu L-Asparaginsäure und Ammoniak katalysiert. L-Asparaginase gehören seit über 30 Jahren zur Basis-therapie akuter, lymphatischer Leukämien (ALL) und einiger maligner Lymphome (Non-Hodgkin-Lymphome, NHL). Wie bereits erwähnt wird angenommen, dass die zytostatische Wirkung durch die Abhängigkeit sensibler Tumorzellen von der Asparaginasezufuhr zustande kommt, was durch einen spezifischen metabolischen Defekt der Asparaginsynthetase bedingt ist. Diese Tumorzellen können L-Asparaginsäure nicht in ausreichendem Maße in L-Asparagin umwandeln und sind deshalb auf die Zufuhr von Asparagin angewiesen. Durch Injektion von L-Asparaginase wird aus dem zirkulierenden L-Asparagin Ammoniak abgespalten und auf diese Weise die Konzentration der für den Tumor essentielle Aminosäure im Blut gering gehalten. Nachdem *in vitro* eine Antitumoraktivität verschiedener Asparaginase-Präparationen beobachtet worden war, wurde das Enzym seit Anfang der achtziger Jahre sowohl zur Behandlung pädiatrischer als auch erwachsener Patienten

eingesetzt ^[27]. In kontrollierten Studien konnte gezeigt werden, dass eine Induktionstherapie ohne L-Asparaginase signifikant schlechtere Ergebnisse sowohl in Bezug auf das krankheitsfreie als auch auf das Gesamtüberleben zeigt ^[31]. Diese Ergebnisse wurden auch in neueren Studien bestätigt ^[40-42].

L-Asparaginase wird im Rahmen von Polychemotherapien zur Induktion sowie in der Reinduktionstherapie eingesetzt. Dauerhafte Remissionen sind mit dieser Therapie bei bis zu 95 % der pädiatrischen Patienten zu erreichen ^[48]. Zum klinischen Einsatz haben sich im Wesentlichen drei verschiedene Asparaginase-Präparationen durchgesetzt ^[4]. Dabei handelt es sich um das aus *E. coli* gewonnene Enzym, welches zum einen in seiner nativen Form verwendet wird und zum anderen modifiziert (als PEG-Asparaginase) Einsatz findet. Um letztere Asparaginase-Präparation zu erhalten, wird an die native *E. coli*-Asparaginase monomethoxyliertes Polyethylenglycol kovalent gebunden. Die dritte Asparaginase-Aufbereitung wird aus dem Bakterium *Erwinia caryophylli* gewonnen.

1.2 Historische Entwicklung

1953 versuchte Kidd ^[33] durch den Einsatz von Meerschweinchen-serum, die in diesem Serum enthaltenen Komplementfaktoren zur Regression von Lymphomen in Ratten und Mäusen zu verwenden. Dieser Ansatz führte zu einer vollständigen Regression der Lymphome in den Versuchstieren, die zunächst den Komplementfaktoren zugeschrieben wurde. Später konnte Broome ^[11] zeigen, dass die Tumor-Regression nicht dem im Serum enthaltenen Komplement zu verdanken war sondern dem Enzym L-Asparaginase ^{[10],[11,12]}. 1964 fanden Mashburn und Wriston, dass eine Asparaginase aus *E. coli* ähnlich wirksam ist wie die des Meerschweinchens ^[36]. Somit war es möglich,

größere Mengen des Enzyms zu gewinnen. Damit konnten nun auch Studien im klinischen Bereich durchgeführt werden ^[17,29,61].

Auf der Suche nach weiteren Möglichkeiten der Asparaginase-Gewinnung fanden Mashburn und Campbell, dass *E. coli* zwei Asparaginasen (EC-1 und EC-2) produzieren, von denen jedoch nur das Isoenzym EC-2 gegen Tumoren wirksam ist ^[16]. In den folgenden Jahren wurde versucht, weitere Bakterienspezies zu identifizieren, aus denen eine klinisch wirksame Asparaginase isoliert werden konnte. Bei dem Enzym aus *Erwinia crysanthemii*, früher als *Erwinia carotovora* bezeichnet, ließ sich ebenfalls eine hohe Aktivität nachweisen, so dass auch dieses Bakterium zur Enzymgewinnung eingesetzt wurde ^[14]. Weitere Organismen mit klinisch wirksamen Asparaginasen sind beispielsweise *Serratia marcescens* und *Vibrio succinogenes* ^[23,24].

Da insbesondere akute lymphatische Leukämien und einige Non-Hodgkin-Lymphome bei Kindern so hervorragend auf das Enzym ansprachen, wurde Asparaginase schon bald als eine Komponente im Induktionsprotokoll zur Behandlung jener Erkrankungen etabliert ^[31] ^[30,57,59]. Das Alter der Patienten, die mit Asparaginase behandelt werden, reicht vom Säuglingsalter bis ins hohe Erwachsenenalter ^[18,21] ^[43,51]. Zur Induktion wird Asparaginase meist zusammen mit Prednison und Vincristin verabreicht ^[26,48].

1.3 Struktur der Asparaginase

Asparaginasen kommen in einer Vielzahl von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen vor ^[9]. Native *E. coli*-Asparaginase hat ein Molekulargewicht von 138 kDa und besteht aus vier identischen Untereinheiten, die jeweils über ein aktives Zentrum verfügen und über nicht-kovalente Bindungen miteinander verknüpft sind ^[58]. In Abb. 1.1 sind die vier Untereinheiten in unterschiedlichen Grautönen dargestellt. Die Lage

der aktiven Zentren ist an den gebundenen Aspartatresten zu erkennen (als raumerfüllende Strukturen dargestellt). Das Molekulargewicht des aus *Erwinia* gewonnenen Enzyms beträgt ebenfalls 138 kDa. Beide Enzyme besitzen eine hohe Aktivität und große Stabilität. Die hohe Substratspezifität manifestiert sich in einer niedrigen Michaelis-Menten-Konstante für L-Asparagin von 6-15 μM . Hohe Konzentrationen von Asparaginsäure oder Ammoniak inhibieren die hydrolytische Aktivität kaum. Die aus *E. coli* und aus *Erwinia* isolierten Enzyme unterscheiden sich in ihrem isoelektrischen Punkt und weisen nur eine mäßige immunologische Kreuzreaktivität auf ^[39,41].

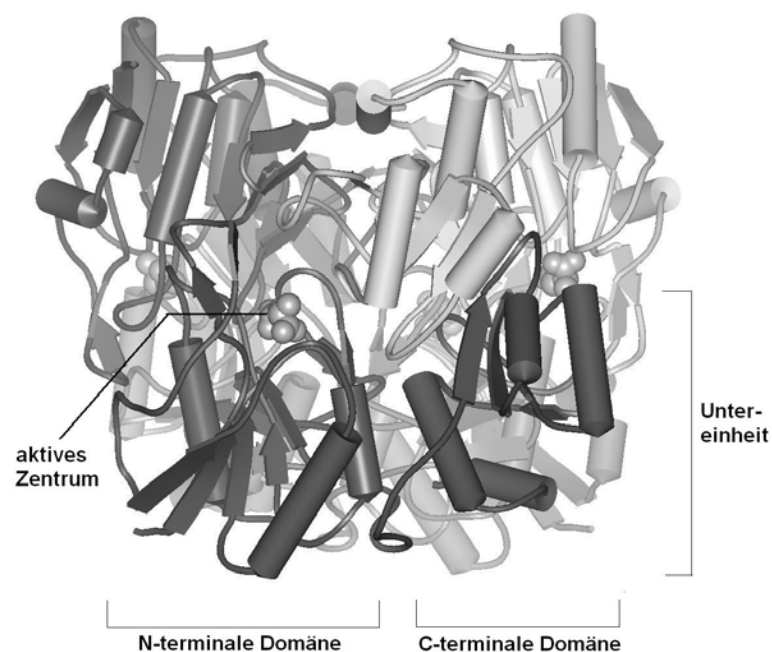


Abb. 1.1 Struktur der *E. coli*-Asparaginase

1.4 Pharmakologische Eigenschaften der Asparaginasen

1.4.1 Pharmakodynamik

Die Hydrolyse von Asparagin durch L-Asparaginase zu Asparaginsäure und Ammoniak führt - wie bereits erwähnt - sehr schnell zu einer Depletion des Serumpools von Asparagin, dessen Konzentration normalerweise bei 40-80 $\mu\text{mol/l}$ liegt ^[38]. Der Asparaginmangel führt zum Ausfall wichtiger Zellfunktionen, indem es zu einer raschen Störung der Proteinsynthese ^[56] und mit Verzögerung zu einer Inhibition der DNA- und RNA-Synthese ^[6] kommt. Angesichts des raschen Zelltodes können Mechanismen wie z. B. die Apoptose nicht ausgeschlossen werden ^[15].

1.4.2 Pharmakokinetik

Bei der Behandlung maligner Erkrankungen wird Asparaginase sowohl auf intramuskulärem als auch auf intravenösem Weg verabreicht. In Deutschland erfolgt seit längerer Zeit nahezu ausschließlich die intravenöse Injektion. Die meisten Ergebnisse hinsichtlich der Konzentrations-Zeit-Kurven ergaben Plasma-Halbwertszeiten von 4-15 Stunden ^[41]. Einige Autoren postulieren, dass nach einer initialen Aufnahme der Asparaginase von einigen Geweben ein Rücktransport des Enzyms ins Plasma erfolgt ^[28]. Entgegen dieser Aussage berichten jedoch Ohnuma *et al.* ^[46] von einigen Plasmaaktivitätsmessungen, die für eine Kinetik erster Ordnung sprechen. Broome ^[11] zeigte, dass in Mäusen 24 Stunden nach Applikation nur geringe Aktivitäten des Enzyms in Milz und Serum nachweisbar waren, wohingegen in der Leber hohe Aktivitäten gefunden werden konnten. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass der größte Teil der Asparaginase über das retikulo-endotheliale-System (RES) eliminiert wird. Nach wieder-

holter Verabreichung identischer Zubereitungen, waren die Eliminations-Halbwertszeiten aus dem Plasma vergleichbar, während nach Gabe von PEG-Asparaginase die Halbwertszeit gegenüber dem nativen Enzym deutlich verlängert war. Die für die *Erwinia*-Asparaginase bestimmten Werte weisen im Vergleich zum *E. coli*-Präparat deutlich kürzere Halbwertszeiten auf [7,49,55]. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass durch Asparaginase, neben einer Depletion des Serum-Asparagins, auch eine vollständige Asparagin-Depletion im Liquor cerebrospinalis erreicht wird. Dies wird auf einen Übertritt von Asparagin aus dem Liquor in die systemische Zirkulation entlang einem Konzentrationsgradienten zurückgeführt [8,55]. Eine Studie von Inge Appel et al. [3] stellt dies jedoch in Frage. Sie beschreibt eine fehlende Asparagin-Depletion im Liquor nach intravenöser Verabreichung von PEG-Asparaginase. Riccardi et al. [53] führten im Rahmen einer Studie zur systemischen Asparaginase-Therapie Untersuchungen an Rhesusaffen und Menschen durch. Die Ergebnisse zeigten, dass für das *E. coli*-Enzym eine Serumaktivität von 100 U/l für eine vollständige Asparagin-Depletion sowohl im Serum als auch im CSF ausreichend ist.

1.4.3 Klinischer Hintergrund

Eine zunehmende Anzahl hämorrhagischer und thrombotischer Zwischenfälle in der Universitätsklinik Münster veranlasste die Arbeitsgruppe dieser Klinik zur Entwicklung eines Drug-Monitoring-Programms für Kinder, die verschiedene Asparaginase-Präparationen im Rahmen ihrer Induktionstherapie für akute lymphoblastische Leukämien und Non-Hodgkin-Lymphome erhalten hatten. Die Präparate Asparaginase medac® und Crasnitin™, welche in einer Dosierung von je 10.000 U/m² Körperoberfläche alle drei Tage zur Induktion verabreicht wurden, bestanden aus Asparaginasen verschiedener *E. coli*-Präparationen. Diese zeigten erhebliche

Differenzen hinsichtlich der Talaktivitäten, die unmittelbar vor jeder Verabreichung gemessen wurden. Im Fall einer Überempfindlichkeitsreaktion wurde die Medikation für die anschließende Reinduktionstherapie von Asparaginase medac oder Crasnitin™ auf Erwinase™ (aus *Erwinia crysanthemii*) umgestellt. Die effektivste Asparagin-Depletion im Plasma von über 90% wurde durch medac-Asparaginase™ erzielt, gefolgt von einer 60%igen Depletion durch Crasnitin™. Durch die Applikation von Erwinase™ wurde lediglich eine 26%ige Depletion erreicht.

Diese Ergebnisse veranlassten zu einer weiteren Studie mit einer reduzierten Dosis von Asparaginase medac™, die darauf abzielte, mit einer Talaktivität von 100 U/l eine vollständige Asparagin-Depletion sowohl im Plasma als auch im Liquor zu erreichen. Dies basierte auf den Erkenntnissen von Riccardi et al. [15,53,63]. Die Autoren zeigten, dass trotz großer interindividueller Variationen eine Dosis von 2500 U/m² KOF Asparaginase medac™ jeden dritten Tag ausreicht, um die gewünschte Aktivität sowie eine komplette Depletion des Enzyms im Serum und Liquor zu erlangen [1,44].

Als Konsequenz der interindividuellen Variationsbreite wurde ein spezielles Drug-Monitoring Programm entwickelt. Die meisten Induktionsprotokolle zur Behandlung von akuten Leukämien verwenden Asparaginase, um eine Depletion über einen Zeitraum von 14 bis 21 Tagen bei pädiatrischen und von 14 Tagen bei erwachsenen Patienten zu erzielen. Da die PEG-konjugierte Asparaginase eine vergleichsweise längere Halbwertszeit als die nativen Formen aufweist, kann eine Asparagin-Depletion über den gewünschten Zeitraum von drei Wochen bereits durch die Verabreichung einer Einzeldosis PEG-Asparaginase erreicht werden. Das Kollektiv der pädiatrischen Patienten der Arbeitsgruppe in Münster zeigte nach einer Dosis von 1000 U/m² Körperoberfläche eine komplette Asparagin-Depletion zwei Wochen nach

der Therapie in der Mehrzahl der Fälle ^[42]. Es wurde eine multivariante Studie zur Erfassung der Beziehung zwischen dem Therapieausgang und einer Vielzahl von Parametern durchgeführt, die Geschlecht, Krankheitsstadium, ZNS-Beteiligung, Grad des LDH-Anstiegs, Höhe der weißen Blutkörperchen, Thrombozytenanzahl, Knochenmarkbeteiligung, ethnische Zugehörigkeit und Primärlokalisation des Tumors berücksichtigten. Die Ergebnisse zeigten jedoch eindeutig, dass einzig und allein der Einsatz des Enzyms Asparaginase über den Therapieerfolg entscheidet.

Die unterschiedlichen Pharmakokinetiken der einzelnen Asparaginase-Präparationen, die sowohl von Asselin et al. ^[5] als auch von Boos et al. ^[8] beobachtet worden waren, wurden ebenfalls durch Ergebnisse großer klinischer Studien bestätigt. Asselin et al. ^[4] untersuchte in einer Studie die drei zur Zeit zur Verfügung stehenden Asparaginase-Präparationen aus *E. coli*, *Erwinia crysanthemii* und pegylierter Asparaginase. Sie verglichen dabei die jeweilige Enzymaktivität sowie die Asparagin-Depletion und die Entwicklung von anti-Asparaginase Antikörpern im Patientenserum, wobei sie signifikante Unterschiede sowohl hinsichtlich der Halbwertszeit als auch der Depletion des Asparagin-Pools feststellten. Darüber hinaus zeigte Asselin einen direkten Zusammenhang zwischen der Pharmakokinetik und dem therapeutischen Effekt von Asparaginase ^[4].

Duval et al. ^[25], die ihre Resultate über den randomisierten Vergleich von *E. coli* und *Erwinia*-Asparaginase während der Induktions- und Konsolidierungstherapie in der EORTC 58881 Studie präsentierten, berichteten über signifikant längere krankheitsfreie Intervalle mit vergleichbarer Remissionsrate bei mit *E. coli*-Asparaginase behandelten Kindern. Jeder der beiden Behandlungszweige schloß mehr als 300 Patienten ein. Nach vier Jahren hatten 75 % (S.E.2,5%) der mit *E. coli*-Asparaginase behandelten Patienten ohne einen Rückfall zu erleiden

überlebt, verglichen mit nur 62 % der Erwinia-Asparaginase-Gruppe (S.E.2,8%, log rank: 2P < 0,001). In diesem Zusammenhang ist jedoch zu erwähnen, dass bei dieser Studie nicht die unterschiedliche Pharmakokinetik der beiden Asparaginase-Typen berücksichtigt worden war.

Die große Bedeutung der Asparaginase bei der Behandlung hämatologischer Erkrankungen, die von den Zellen des lymphatischen Systems ausgehen, wurde durch die Ergebnisse zahlreicher Studien bestätigt, wohingegen Berichte über den Einsatz dieses Enzyms zur Behandlung von Patienten mit akuten myeloischen Leukämien eher spärlich sind.

Clarkson et al. ^[21] publizierten ihre Ergebnisse in einer Studie mit 34 erwachsenen Patienten, die an akuter myeloischer bzw. myelomonozytischer Leukämie litten und eine Monotherapie mit Asparaginase erhalten hatten. Drei Patienten erlangten eine komplette Remission. Ein Patient erreichte eine gute Teilremission, die Remissionsdauer betrug jedoch insgesamt nur 1-3 Monate. Ohnuma et al. ^[46,47] verglichen zwei unterschiedliche Asparaginase-Therapieschemata, die zehn Erwachsene und zwei Kinder mit akuter myeloischer Leukämie einschlossen. Die beiden pädiatrischen Patienten sprachen überhaupt nicht auf die Therapie an, wobei von den Erwachsenen einer eine komplette Remission erreichte. Ein anderer Patient verstarb an einer fulminanten Lungenembolie. Fünf weitere Patienten zeigten kaum eine Veränderung im peripheren Blut nach Asparaginase-Therapie.

Pratt et al. ^[50] behandelten ebenfalls drei Kinder mit akuter myeloischer Leukämie, von denen eines nach wöchentlicher Gabe von 20.000 U/m² Körperoberfläche *E. coli*-Asparaginase eine Teilremission erlangte. In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass niedrigste Asparaginsynthetaseaktivität in monoblastischen FAB M5 Zellen auf

eine Effektivität von Asparaginase bei der Behandlung einer spezifischen Untergruppe der akuten myeloischen Leukämie hinweist^[63]. Zur genaueren Klärung dieser Fragestellung werden weitere klinische Studien durchgeführt.

1.4.4 Immunogenität der Asparaginase und Nebenwirkungen der Therapie

Da die Immunogenität körperfremder Proteine mit der taxonomischen Entfernung des Ursprungsorganismus sowie mit der Masse und der strukturellen Komplexität des Proteins ansteigt, ist sie auch in diesem Fall von großer Bedeutung. Bei Überempfindlichkeitsreaktionen kann die Therapie aufgrund eingeschränkter Kreuzimmunogenität oft mit einem anderen Asparaginase-Präparat weitergeführt werden, da es bei einem Präparatwechsel von nativer *E. coli*-Asparaginase zu PEG-Asparaginase nur bei 20-25% der Patienten zu einer erneuten Überempfindlichkeitsreaktion kommt^[41].

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die Verabreichung von Asparaginase zur Bildung spezifischer Antikörper führt. Die durch diese Antikörper hervorgerufenen Nebenwirkungen reichen von Lokalreaktionen an der Injektionsstelle bis hin zu systemischer Anaphylaxie. In anderen Fällen findet eine rasche Inaktivierung des Enzyms statt, ohne Zeichen einer klinischen Überempfindlichkeitsreaktion^[5]. Dabei fällt die Aktivität des Enzyms unter die Quantifizierungsgrenze im Serum ab. Der genaue Mechanismus, der für jene Inaktivierung verantwortlich ist, konnte noch nicht endgültig aufgeklärt werden. In der Diskussion sind sowohl inaktivierende Antikörper als auch eine enzymatische Spaltung des Enzyms. Außerdem wird das Vorhandensein von Antikörpern beobachtet, wobei es weder zu einer allergischen Reaktion noch zu einer Inaktivierung kommt. Bei der Überempfindlichkeitsreaktion kann von einer Reaktion vom Typ I ausgegangen werden. Unklar ist jedoch

noch, welche Epitope an der Reaktion beteiligt bzw. dafür verantwortlich sind. Viele Patienten wiesen erhöhte Titer von Antikörpern der IgG-Subklassen IgG-1, IgG-3 und IgG-4 auf, wobei Antikörper vom Typ IgG-2 nicht gefunden wurden. Körholz et al. konnten zeigen, dass jene Patienten mit Antikörpern der Klasse IgG-3 ein besonders hohes Risiko für das Auftreten von allergischen Reaktionen hatten ^[19,35]. Die Inzidenz für Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp (Typ I) nach *E. coli*-Asparaginase-Gabe liegt bei verschiedenen Untersuchungen zwischen 5 und 33% aller behandelten Patienten. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Überempfindlichkeitsreaktionen nimmt zum einen mit der Zahl der Applikationen während eines Therapiezyklus und zum anderen bei wiederholter Gabe nach einem längeren Therapieintervall ohne Asparaginase-Gabe deutlich zu ^[22,37].

Um Aussagen über eine mögliche vorzeitige Inaktivierung machen zu können, wurden von Boos und Mitarbeitern eine Reihe von Drug-Monitoring-Programmen aufgebaut, in deren Rahmen sowohl verschiedene Asparaginase-Zubereitungen als auch unterschiedliche Dosierungen eingesetzt wurden ^[42]. Dabei erfolgte die Bestimmung der Asparaginase-Aktivitäten zu unterschiedlichen Zeiten nach Gabe des Enzyms. Die gemessenen Aktivitäten dienten zum einen der Dosisfindung und zum anderen auch als Hinweis für das Vorliegen von inaktivierenden Antikörpern.

Assays zum Nachweis von Antikörpern gegen Asparaginase in Patientenseren wurden von Wang und Mitarbeitern sowie Albertsen und Mitarbeitern entwickelt ^[2,60]. Es zeigte sich allerdings, dass mit den derzeit verfügbaren Methoden zum Nachweis von Asparaginase-Antikörpern aufgrund eingeschränkter Sensitivität und Spezifität Vorhersagen für den einzelnen Patienten nicht möglich sind. In unserem Assays werden die native Asparaginase als Antigen und

Serumproben von Patienten mit klinisch manifester allergischer Reaktion als Bezug verwendet.

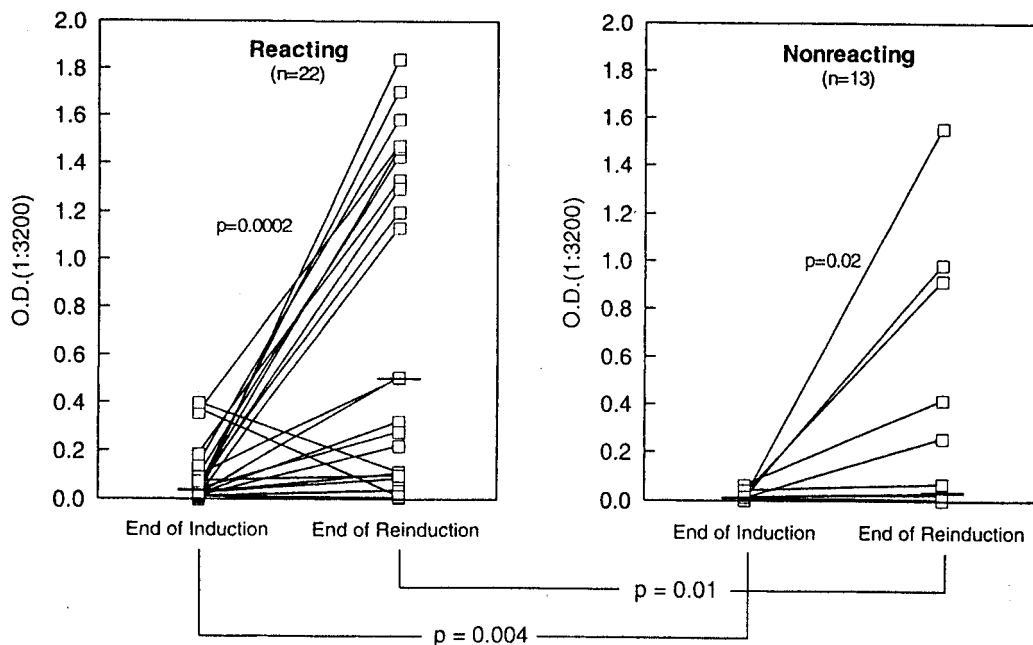


Abb. 1.2 IgG-Titer vor und nach Reinduktion von Patienten mit und ohne allergische Reaktion auf Asparaginase (aus Woo et al., 1998)

Der Verlauf von Antikörpertitern bei Patienten mit und ohne allergischer Reaktion gegen das komplette Asparaginasemolekül ^[62] ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Zur Erhebung dieser Daten wurde das Asparaginasemolekül als Antigen im Rahmen eines ELISAs vorgelegt. Von den Patienten wurden jeweils nach Beendigung der Induktionsphase sowie nach der Reinduktion Seren gewonnen und im ELISA auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen Asparaginase getestet. Es ist zu erkennen, dass die Verläufe der Antikörpertiter bei beiden Patientengruppen grundsätzlich vergleichbar sind. Während jedoch bei den 13 Patienten ohne allergische Reaktion, wie im rechten Teil der Abbildung dargestellt, gleichbleibende oder ansteigende Titer zu beobachten sind, wurden bei einigen der 22 Patienten mit einer

Überempfindlichkeitsreaktion niedrigere Antikörpertiter bestimmt als vor der Reaktion.

Dieses Ergebnis zeigt zweifelsfrei, dass durch jene Nachweismethode eine Vorhersage für den individuellen Patienten nicht möglich ist. Neben klinisch manifesten allergischen Reaktionen und stiller Inaktivierung zählen akute Pankreatitis, Beeinträchtigungen der Leberfunktion und eine komplexe Störung der Hämostase, die u. a. sowohl zu Blutungen als auch zu Thrombosen führen kann. Gerinnungskomplikationen gehören zu den häufigsten Nebenwirkungen der Asparaginasebehandlung. Ebenfalls zu beobachtende Beeinträchtigungen der Glukosetoleranz und der neurologischen Funktionen erreichen dagegen selten ein klinisch relevantes Ausmaß. Auch wenn die Mechanismen dieser Nebenwirkungen noch nicht vollkommen geklärt sind, wird vermutet, dass Asparaginase über die Reduktion der Konzentrationen von L-Asparagin und L-Glutamin im Blut sowie durch die Beeinträchtigung der Proteinsynthese in der Leber die nicht allergischen Nebenwirkungen hervorruft ^{[20,34,50],[45]}.

1.4.5 Assays zum Nachweis von Antikörpern gegen Asparaginase

Im Jahre 1998 führten erste Kontakte der Arbeitsgruppe um Boos in Münster mit unserer Gruppe in Marburg zu der Idee, den bis zu diesem Zeitpunkt angewandten, wenig sensitiven und recht unspezifischen Assay zum Nachweis von Antikörpern gegen Asparaginase selektiver zu gestalten, um so die prognostische Aussagekraft zu verbessern. Die Erwartung war, dass durch einen solchen selektiven Nachweis von Antikörpern einerseits die Therapie individueller gestaltet und andererseits die Nebenwirkungsrate erheblich verringert werden könnte. Darüber hinaus sollte es auf diese Weise möglich sein, die zur Kontrolle des Asparaginase-Aktivitätszeit-Verlaufs durchgeführten sechs bis acht Blutentnahmen pro Gabe drastisch zu verringern und

damit auch die Belastung, insbesondere für pädiatrische Patienten, zu reduzieren.

Um fundiertere Aussagen über den Verlauf der Asparaginase-Therapie treffen zu können, müssen zunächst Art und Konzentration der gebildeten Antikörper vor und während der Therapie genau differenziert werden. Als Arbeitshypothese wurde von der Annahme ausgegangen, dass die unterschiedlichen Reaktionen der Patienten auf der Bildung von Antikörpern gegen verschiedene Epitope des Asparaginase-Proteins beruhen. Deshalb wurde damit begonnen, einen epitopspezifischen Antikörper-Assay aufzubauen.

Zunächst wurde versucht, das Asparaginase-Molekül durch Verdauung mit Proteasen in einzelne Teilstücke zu zerlegen, um Fragmente mit nur einem oder einigen wenigen Epitopen zu erhalten. Diese Enzymfragmente wurden - wie zuvor das komplette Asparaginase-Molekül - als Antigen in einem herkömmlichen ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) eingesetzt. Dieser Ansatz erwies sich jedoch wegen der nicht ausreichenden antigenen Aktivität der Teilpeptide als unbrauchbar. Deshalb wurden größere Asparaginase-Fragmente als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST) exprimiert und im folgenden als Antigene eingesetzt. Diese Vorarbeiten wurden von Dr. Stefan Schleper in Marburg geleistet. Die von Schleper konstruierten und als Fusionsproteine mit GST exprimierten Fragmente sind in Abb. 1.3 dargestellt.

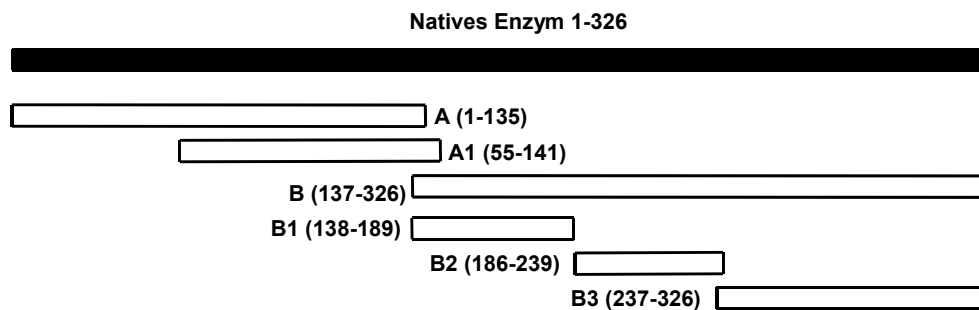


Abb.1.3 Asparaginase-Fragmente, die als Fusionsproteine mit GST zur Bestimmung von Antikörpertitern verwendet wurden. Die Zahlen beziehen sich auf die Lage in der Aminosäuresequenz

Fragment A entspricht 40% der Sequenz am N-terminalen Ende, während Fragment B die restlichen 60% enthält. Die kleineren Fragmente A1 bzw. B1 bis B3 sind wiederum Bruchstücke von A und B. Die Auswahl der Fragmente erfolgte dabei eher zufällig, da zu diesem Zeitpunkt noch keine detaillierten Informationen über die Epitope der *E. coli*-Asparaginase vorlagen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob sich die beschriebenen Fusionsproteine als Antigene bei der quantitativen Bestimmung von anti-Asparaginase-Antikörpern in Patientenseren eignen und ob ihre Verwendung Vorteile gegenüber den herkömmlichen Verfahren bieten. Außerdem sollte geprüft werden, ob und inwieweit das beobachtete Antikörper-Profil Hinweise auf den klinischen Verlauf der Therapie (allergische Reaktionen bzw. stille Inaktivierung) erlaubt.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Geräte

Achtkanal-Pipette	Eppendorf, Hamburg
Response 4850 Autoklav	Tuttnauer(Systsc.),
Wettenberg	
Brutschrank	Heraeus, Osterode
DNA Thermal Cyclor	Perkin-Elmer, Langen
Digitalkamera, D120 Zoom	Kodak, Stuttgart
Microplatereader, 3550-UV	BioRad, München
Fraktionssammler RediFrac	Eppendorf, Hamburg
Gelelektrophoresekammer	PHASE, Lübeck
Microplate Washer M96FlowICN	Titertek, Rheinbach
pH-Meter Toledo 340	Mettler, Gießen
Schüttelinkubator	Biometra, Göttingen
Spannungsgerät LKB GPS 200/400	Amersham Pharmacia,
	Freiburg
Spektrophotometer Specord M500	Zeiss, Jena
Spectrophotometer Ultrospec 2000	Amersham Pharmacia
	Freiburg
Thermoblock	Stratagene, Heidelberg
Tischzentrifuge, Biofug	Hereaus, Osterode
Ultraschallstab Sonoplus GM70	Bandelin, Berlin
Zentrifuge Suprefuge 22	Hereaus, Osterode

2.1.2 Chemikalien

ABTS 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt	Sigma Deisenhofen
Acrylamid/ Bisacrylamid (30/0,8 Lösung)	Sigma, Deisenhofen

Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8 Lösung)	Roth, Karlsruhe
Agarose für DNA-Gelelektrophorese	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	USB, Hamburg
4-Chlor-1-naphthol	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Blue	Gibco, Karlsruhe
ECL Western blotting detection reagents	Amersham Pharmacia, Freiburg
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glycin	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen
Hefeextrakt	ICN Biomedicals, Inc.
Isopropyl-Thiogalaktosid	Sigma, Deisenhofen
Luria Broth-Medium	Gibco, Karlsruhe
Magermilchpulver	Heirler, Radolfzell
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Sigma, Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin	Merck, Darmstadt
Ponceau S	Serva, Heidelberg
Rinderserumalbumin	Sigma, Deisenhofen
Trypton	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Sigma, Deisenhofen

Alle weiteren Chemikalien wurden in p. a. Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe) bezogen. Für wässrige Lösungen und Puffer wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Dialyseschlauch, Sevapor	Serva, Heidelberg
Einweg-Plastik-Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Gel-Blotting Papier GB 002	Schleicher & Schuell, Dassel
Immobilon-P, PVDF, 0,45 µM	Millipore, Eschborn
Nunc-immuno Modules MaxiSorp F16	Nunc A/S, Roskilde-Dänemark

2.1.4 Säulenmaterial

Glutathion-Sepharose™ 4-Fast-Flow	Amersham Pharmacia, Freiburg
-----------------------------------	---------------------------------

2.2 Marker, Enzyme und Kits

2.2.1 Marker

100 bp DNA-Leiter	Peqlab, Erlangen
100 kDa-Marker für SDS	Peqlab, Erlangen

2.2.2 Enzyme

Asparaginase medac®	Medac, Hamburg
Asparaginase aus <i>Erwinia chrysanthami</i>	Sigma, Deisenhofen
Polyethylenglycol-konjugierte Asparaginase (PEG-Asparaginase)	Medac-Schering

2.2.3 Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Quantum Prep Plasmid Miniprep	Bio Rad, München
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim

2.3 Vektoren und Bakterien

2.3.1 Vektoren

Vektor pGEX-4T-3	Amersham Pharmacia
------------------	--------------------

2.3.2 Bakterien

<i>E. coli</i> BL21□	Harms et al., 1991
----------------------	--------------------

Alle durchgeführten Arbeiten mit gentechnisch veränderten Bakterienstämmen wurden gemäß Gentechnikgesetz (Gen TG) vom 20.05.1990 durchgeführt und gehörten zur Sicherheitsstufe S1. Bei Experimenten anfallende, mit Bakterien kontaminierten Lösungen und Gefäße wurden getrennt gesammelt und umgehend durch Hitzesterilisation für 30 Minuten bei 130°C und 2,5 bar im Autoklaven vernichtet.

2.4 Computerprogramme

Excel 2000	Microsoft
Sigma Plot 5.0	Jandel Scientific
Word 2000	Microsoft

2.5 Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien

Agar-Platten	LB-Medium mit 1,5 % (w/v)
Agar	
Ampicillin	100 mg/ml (steril filtriert)
Bindungspuffer	PBS, pH 7,3
	140mM NaCl
	2,7mM KCl

	10mM Na ₂ HPO ₄
	1,8mM KH ₂ PO ₄
Elutionspuffer	50mM Tris(TM)-HCL
	10mM red. Glutathion (pH8)
Lämmli-puffer (4x)	250 mM Tris/HCL pH 6,8
	8% (v/v) 2-Mercaptoethanol
	40% (v/v) Glycerin
	4x10 ⁻³ % (w/v) Bromphenolblau
LB-Medium (pro Liter)	10g Trypton
	5g Hefeextrakt
	10g NaCl, pH 7,4
Carbonat/ Bicarbonat-Puffer	50mM Na ₂ CO ₃
	50mM NaHCO ₃ , pH 9,4
PBS-Puffer 10fach (pro Liter)	14,2g Na ₂ HPO ₄
	2,45g K ₂ HPO ₄
Stop-Lösung	SDS 5%
	0,04 % H ₂ O ₂
TAE-Puffer	40mM Tris/ Acetat
	1mM EDTA

2.6 Methoden und Probenmaterial

Glycerolstocks

Es wurden 0,5 ml einer Übernachtskultur mit 0,5 ml sterilem 50%igem (v/v) Glycerol gemischt und die Bakteriensuspension bei –20 °C gelagert.

LB-Platten

LB-Medium	10 g/l Trypton
	5 g/l Hefeextrakt
	10 g/l NaCl

LB _{Amp} -Platten	25 g/l LB-Medium
	8 g/l Agar Agar
	1 µg/l (w/v) Ampicillin

Ampicillin wurde in H₂O in einer Konzentration von 100 mg/ml angesetzt. LB-Medium und Agar wurden in destilliertem Wasser suspendiert und mit 5 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Das Medium wurde autoklaviert und mit dem sterilfiltrierten Antibiotikum versetzt. Sterile Petrischalen wurden mit ca. 20 ml Medium ausgegossen und bei 4 °C gelagert. Um *E. coli* auf LB-Platten zu kultivieren, wurden Bakterien aus Glycerolstocks auf LB-Platten ausgestrichen und im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die LB-Platten wurden bei 4 °C gelagert und standen zum Animpfen von Kulturen für ca. zwei Wochen zur Verfügung.

Übernachtskulturen

LB _{Amp} -Medium	25 g/l LB-Medium
	0,1g/ml (w/v) Ampicillin

LB-Medium wurde in destilliertem Wasser suspendiert und mit 5 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Daraufhin wurde es autoklaviert und bei Raumtemperatur steril gelagert. Für eine Übernachtskultur wurden 50ml und 100ml LB-Medium mit sterilfiltriertem Antibiotikum versetzt und mit Bakterien angeimpft. Es wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

Proteinexpression und Proteinisolierung

Lämmli-Puffer (4x):	250 ml/Tris HCL pH 6,8
	8 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
	40 % (v/v) Glycerin
	4x 10 ³ % (w/v) Bromphenolblau

Für die Herstellung des rekombinanten Proteins im analytischen Maßstab wurden 400 ml-Übernachtskulturen mit transformierten *E. coli*-Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Kulturen wurden auf eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,6 eingestellt. Nach einer Inkubation für 30 Minuten bei 25 °C, wurden 1 ml-Proben abgenommen, bei 250 rpm zentrifugiert und das Bakteriensediment in TE-Puffer resuspendiert und bei –20 °C gelagert. Die Kultur wurde dann mit IPTG (0,5 mM) induziert. Die anschließende Expression erfolgte über 3-4 Stunden bei 37 °C. Zwischenzeitlich wurden aus dem Expressionsansatz 1 ml-Proben entnommen, um die (OD) zu kontrollieren. Sobald eine OD von 0,45- 0,55 erreicht war, wurde die Bakterienkultur fünf Minuten bei 5000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend bei –20 °C eingefroren. Zuvor wurde noch eine weitere 1 ml-Kontroll-Probe von der Bakterienkultur nach der Expression entnommen, abzentrifugiert und in der oben beschriebenen Weise gelagert.

Für einen analytischen Nachweis der Proteine wurde das Bakteriensediment in 50 µl Lämmli-Puffer resuspendiert und in 20 µl des Proteinextraktes durch SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Gewinnung größerer Proteinmengen wurde ein 1 L-Maßstab gewählt. Zunächst wurde eine 100 ml-Übernachtskultur angezogen und in 1 Liter LB(Amp)-Medium überführt. Anschließend wurde bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 inkubiert. Daraufhin wurde eine 1 ml-Probe entnommen, die Bakteriensuspension bei 13 000 rpm sedimentiert und die Bakterien bei

–20 °C gelagert. Die Kulturen wurden mit 5 mM IPTG induziert und bei 37 °C über einen Zeitraum von 24 Stunden exprimiert. Dann wurden die Bakterien bei 5000 rpm und 4 °C sedimentiert und bei –20 °C gelagert. Die Zellen wurden vor dem Aufschluß der Bakterien in 40 ml PBS-GST-Puffer resuspendiert. Danach erfolgte der Aufschluß durch hochfrequenten Ultraschall (50% Intensität, 15x 15 Sekunden Intervall mit jeweils 15 Sekunden Pause dazwischen, um eine zu starke Erhitzung der Lösung zu vermeiden). Durch eine daran anschließende fünfminütige Zentrifugation bei 12000 rpm wurde unlösliches Material sedimentiert.

Aufschluß der Inclusion-Bodies

Bei der Expression der Fusionsproteine kam es zur Bildung von sog. Einschlusskörperchen (inclusion-bodies). Um diese aufzuschließen, wurden die Pellets mit 8 ml Puffer (8 M Harnstoff, 0,35 M NH_4HCO_3 , pH 8) versetzt und 30 Minuten bei 4 °C belassen. Anschließend wurde bei 12000 rpm ca. 2 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde zur nachfolgenden Dialyse in einen Dialyseschlauch gefüllt.

Dialyse

Die Dialyse erfolgte über Nacht bei 4 °C in 2 l PBS-GST-Puffer, um den Harnstoff zu entfernen. Dabei wurde der Puffer nach 5 Stunden gewechselt. Die dialysierte Lösung wurde vor der Affinitätschromatographie maximal 2 Tage bei 4 °C gelagert.

Affinitätschromatographie

Wasser und Chemikalien, die zur Puffer-Präparation benutzt wurden, wurden vor der Verwendung gefiltert (45 µm Filter).

Binde-Puffer:	PBS, pH 7,3 140 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,3)
Elutions-Puffer:	50 mM Tris TM -HCL, 10 mM red. Glutathion, pH 8

Die Säule (1 x 3 cm) wurde mit Glutathion-SepharoseTM Fast Flow gefüllt und mit 20 ml PBS-GST-Puffer equilibriert (0,6-0,8 ml/min). Anschließend wurde die Lösung aus dem Dialyseschlauch mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,4 ml/min aufgetragen. Im folgenden Schritt wurde mit dem Binde-Puffer mit einer Auftragsgeschwindigkeit von 0,6-0,8 ml/min gespült, bis nach ca. 20 min. eine OD von < 0,04 erreicht war. Dann erfolgte die Elution mit dem oben beschriebenen Puffer und einer Flussgeschwindigkeit von 0,6 ml/min. Insgesamt wurde mit 30 ml Puffer eluiert. 1,5 ml-Fraktionen wurden gesammelt und bei -20 °C eingefroren.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngelpuffer:	1,5 M Tris / HCL, pH 8,8
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris / HCL, pH 6,8
Laufpuffer:	250 mM Tris 1,9 M Glycerin 35 mM SDS

Mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) kann ein Proteingemisch unter denaturierenden Bedingungen der Größe nach aufgetrennt werden. Natriumdodecylsulfat ist ein Detergenz, das sich an Proteine anlagert und ihre native Struktur aufhebt.

Außerdem bewirkt SDS eine hohe negative Ladungsdichte an der Proteinoberfläche. Die ursprünglichen Ladungseigenschaften der Proteine werden dabei überlagert. Nach Anlegen einer Spannung an das Polyacrylamid-Gel wandern die SDS-Protein-Komplexe in Abhängigkeit ihrer Masse unterschiedlich schnell durch die Gelmatrix. Aufgrund besonderer Aminosäurevorkommen kann jedoch ein verändertes Laufverhalten auftreten.

Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte in einer vertikalen Apparatur. Durch die Zugabe von APS (Adenosine 5'-phosphosulfat; Sigma) und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin; Sigma) wurde der Polymerisationsstart eingeleitet. Nach Einsetzen der Polymerisation wurde die Trenngellösung in die Apparatur gegossen und mit einer dünnen Wasserschicht überdeckt. Nach abgeschlossener Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser abgekippt und die Sammelgellösung nach Polymerisationsstart über das Trenngel gegeben. Anschließend wurden die Taschen für die Proteinproben im Sammelgel mit einem Gelkamm vorgeformt. Die Proben wurden im folgenden mit 4-fach konzentriertem Lämmli-Puffer versetzt und im Heizblock bei 95 °C fünf Minuten lang hitzedenaturiert. Danach wurden 20 µl der Proben auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde der SDS-PAGE Standardmarker der Firma Sigma verwendet. Die Gesamtlaufzeit der SDS-PAGE betrug 75 Minuten, wobei zu Beginn über einen Zeitraum von 15 Minuten eine Spannung von 80 V angelegt und anschließend auf 180 V erhöht wurde.

Coomassie-Färbung

Färbelösung:	45 % (v/v) Methanol
	10 % (v/v) Essigsäure
	0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R
Entfärbelösung:	5 % Ethanol
	7 % Essigsäure

Polyacrylamid-Gele wurden in Färbelösung erhitzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem am Ende dieses Versuchsschrittes das gesamte Gel blau gefärbt war, diente der Entfärbevorgang dazu, die nicht proteinhaltigen Bereiche wieder zu entfärben, um so die einzelnen Banden sichtbar zu machen. Zur dauerhaften Dokumentation wurde das Gel mit einer Gel-Kamera fotografiert.

Proteinfärbung durch Ponceau-Färbung

Ponceau-Lösung:	0,2 % (w/v) Ponceau S
	3 % (v/v) Trichloressigsäure

Die Ponceau-Lösung diente der Proteinfärbung auf einer PVDF-Membran. Um einen späteren Größenvergleich zu ermöglichen, wurden die Banden des Proteinmarkers abgetrennt und aufbewahrt.

ELISA mit Asparaginasen und GST-Asparaginase-Fusionsproteinen als Antigen

Der durchgeführte ELISA entspricht weitgehend dem Standardverfahren, jedoch diente als Antigen nicht die komplette Asparaginase, sondern eines der zuvor beschriebenen Fusionsproteine mit GST. Das Prinzip des Tests ist schematisch in Abb. 2.1 dargestellt. Zunächst

werden die Asparaginase-GST-Fusionsproteine an die Mikrotiterplatte gebunden. Nach Inkubation mit verdünntem Patientenserum und Wegwaschen nicht gebundener Antikörper wird ein mit Peroxidase gekoppelter Sekundärantikörper (gegen den F_c -Teil von humanem IgG) zugegeben. Schließlich wird als Maß für die Menge dieses Antikörpers die Aktivität der Peroxidase über die Menge des aus ABTS gebildeten grünen Farbstoffs bei 405 nm oder 495 nm gemessen.

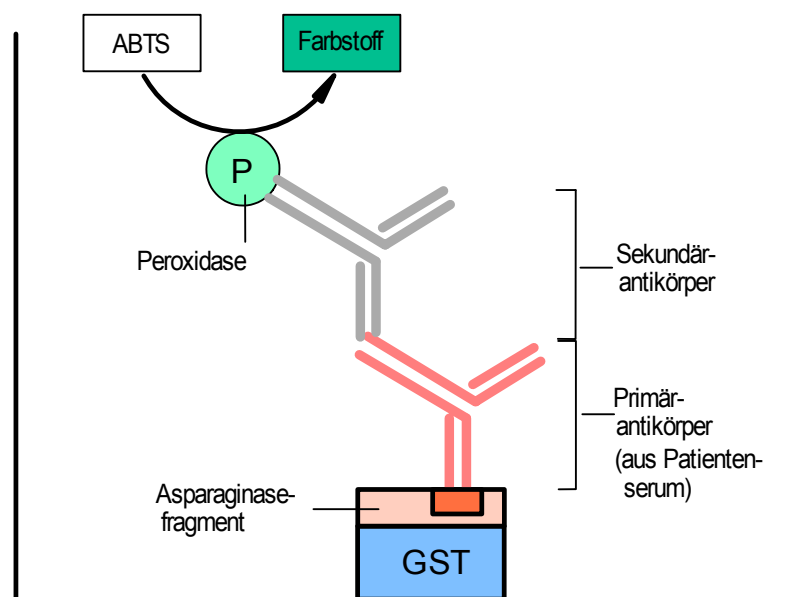


Abb. 2.1 Prinzip des eingesetzten Antikörper-Assays. Nach Bindung der Asparaginase- GST- Fusionsproteine an die Mikrotiterplatte, Inkubation mit Erstantikörper (= Patientenserum), anschließend Peroxidase gekoppelter Sekundärantikörper und Bestimmung der Antikörpermenge anhand der durch ABTS sichtbar gemachten Peroxidaseaktivität

Zu Beginn wurden die Mikrotiterplatten mit je 50 µl einer 1:100 mit Carbonat/Bicarbonat-Puffer verdünnten Lösung der Fragmente ge-coatet und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am darauf folgenden Tag

wurde die Antigen-Lösung abgegossen und die Platte anschließend mit Hilfe eines automatischen Waschers zweimal mit 300 µl PBST pro Well gespült. Im Anschluss daran wurden unspezifische Bindungsstellen drei Stunden lang mit je 300µl mit 5% Magermilchpulver in PBST geblockt. Dann wurde erneut dreimal mit 300 ml PBST/Well gewaschen. Als Quelle für die Erst-Antikörper dienten in der Regel 1:100 mit Blockierlösung verdünnte Patienten-Seren (50 µl Verdünnung/well). Die Mikrotiterplatte wurde anschließend eine Stunde auf den Schüttler gestellt. Es folgte wieder ein Waschvorgang (viermal mit PBST). Um eine Färbereaktion mit ABTS zu ermöglichen, wurden 50µl des 1:10.00 verdünnten, Peroxidase-konjugierten Zweit-Antikörpers (Affini-pure Anti-human IgG aus Ziege) aufgetragen. Es wurde erneut viermal mit PBST gewaschen. Zum Schluss erfolgte die Färbereaktion mit ABTS, das jeweils kurz vor Verwendung als 0,1%ige Lösung in 0,1 M Citratpuffer angesetzt wurde. Die Reaktion wurde mit 0,04 %igem H_2O_2 gestartet. In jedes well wurden anschließend 100µl des Färbereagens hinzugegeben. Die Platten wurden für ca. 30 min. bei 37 °C inkubiert, bevor die Färbereaktion 1:1 mit SDS-Puffer abgestoppt wurde. Zur genauen Erfassung des AK-Titers wurden die Platten bei 405 nm oder 495 nm im ELISA-Reader photometrisch vermessen.

2.8 Untersuchungsmaterial

Zur Verfügung standen uns Proben von Patientenseren, die in Münster im Rahmen einer detaillierten Studie gesammelt worden waren ^[40].

Zwischen Dezember 1996 und Januar 1999 wurden 70 Kinder (30 Jungen und 40 Mädchen) mit erstmals diagnostizierter ALL (n=68) oder NHL (n=2) von fünf Zentren der ALL-BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) Studiengruppe in ein Drug-Monitoring aufgenommen. Alle Kinder wurden in der Reinduktion nach dem ALL/NHL-BFM 95 Protokoll behandelt, erhielten jedoch PEG-Asparaginase. Das Alter der Patienten reichte von 5 Monaten bis 17 Jahren (mittleres Alter 6 Jahre

und neun Monate; Median 6 Jahre). Nach 8 Infusionen nativer *E. coli*-Asparaginase (Asparaginase medac®) während der Induktionsphase, zeigten insgesamt 66 Patienten keine klinischen Zeichen einer immunologischen Reaktion, 4 Patienten hingegen hatten in dieser Phase eine Überempfindlichkeitsreaktion. Aus diesem Grund wurde die weitere Auswertung auf die 66 Patienten ohne Reaktion in der Induktionsphase begrenzt.

Die Reinduktionstherapie gestaltete sich folgendermaßen: Am 8. Tag des Behandlungsplans wurden 1000 U/m² PEG-Asparaginase (Oncaspar™) über einen Zeitraum von 2 Stunden intravenös appliziert. Diese Gabe stellte den Ersatz der ursprünglich vorgesehenen 4 Dosen von 10.000 U/m² BSA *E. coli*-Asparaginase an den Tagen 8, 11, 15 und 18 der Reinduktionstherapie dar, wie es im ALL/NHL-BFM 95 Protokoll definiert ist. Die Chemotherapie der Reinduktion umfaßt außerdem tägliche Gaben von Dexamethason (DEXA; 10 mg/m² an den Tagen 1-31), sowie Vincristin (VCR; 1,5 mg/m² an den Tagen 8, 15, 22 und 29 ^[52,54].

Die Studiendaten individueller Patienten zeigten Asparaginase-Serumaktivitäten von wenigstens 100 U/l über einen Zeitraum von 14-21 Tagen bei einer Gabe von 1000 U/m² Oncaspar™. Diese Aktivität gilt als ausreichend zur adäquaten Suppression von Asparagin sowohl im Plasma als auch im Liquor ^[53]. Da in gegenwärtigen Protokollen mit *E. coli*-Asparaginase eine Serumdepletion über einen vergleichbaren Zeitraum erreicht wird ^[8], wurde eine Verabreichung von 1000 U/m² am achten Behandlungstag des Protokolls als angemessen erachtet, um eine Serum-Konzentration von 100 U/l für wenigstens 14 Tage und eine Konzentration von 50 U/l bis zum 21. Behandlungstag zu erreichen.

Für die Laborversuche wurden alle drei bis vier Tage Blutproben abgenommen, bis die Serum-Aktivität unter die Nachweisgrenze abgesunken war. Sofort nach der Blutentnahme wurden die Proben zentrifugiert. Das Serum wurde umgehend vermessen. Da keine Blutproben zur Messung der Enzymaktivität ein, zwei und drei Wochen nach Asparaginase-Verabreichung eines jeden Patienten von identischen Tagen zur Verfügung standen, wurden die Daten der Tage 7 und 8, 12-14 sowie 20-22 gepoolt für die Zeitabschnitte ein, zwei und drei Wochen. Sofern mehr als eine Blutprobe aus einem der drei Zeitabschnitte von einem Patienten vorhanden war, wurde eine der Proben nach dem Zufallsprinzip ausgewählt.

Die Enzymaktivitätsmessung wurde in einem Standard-Asparaginase-Puffersystem vorgenommen, wobei das nach Reaktion mit Nessler's Reagenz freigesetzte Ammonium photometrisch bei 450 nm gemessen wurde. Die Quantifizierungsgrenze dieses Assays liegt bei 20 U/l. Details zu diesem Aktivitäts-Assay finden sich in Boos *et al.* ^[1,8].

In der vorliegenden Arbeit wurden Seren von 30 Patienten des oben genannten Kollektivs und einige weitere Seren von Patienten außerhalb dieses Kollektivs herangezogen. Die Untersuchung aller Seren war nicht möglich, da nicht von allen Proben ausreichend Restmaterial zur Verfügung stand.

3 Ergebnisse

3.1 Expression und Charakterisierung der GST-Fusionsproteine

Die Fusionsproteine mit den in Abb. 1.3 definierten Asparaginasefragmenten sowie insertfreie Glutathion-S-Transferase wurden wie unter 2.7 beschrieben exprimiert und durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Die gewonnenen Protein-Präparationen enthielten Proteine mit den erwarteten Massen (A-GST: 40 kDa, A1-GST: 36 kDa, B-GST: 46 kDa, B1-GST: 31.5 kDa, B2-GST: 32 kDa, B3-GST: 36 kDa) und waren in der SDS-PAGE weitgehend homogen. Sie wurden nach entsprechender Verdünnung in etwa gleichen Konzentrationen als Antigene im ELISA-Assay (siehe Abschnitt: 3.3) eingesetzt.

3.2 Bestimmung von Antikörpertitern gegen Asparaginase-GST-Fusionsproteine

Die meisten der Fusionsproteine, nicht aber GST selbst, erwiesen sich als effiziente Antigene. Zur Erprobung des Immunoassays wurde statt Patientenserum zunächst ein käufliches, polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen *E. coli*-Asparaginase (Sigma-Aldrich) eingesetzt. Die Ergebnisse der Doppelbestimmungen (durchgeführt wie in Abschnitt 3.3 beschrieben) mit den verschiedenen Fusionsproteinen aus Asparaginasefragmenten und GST (A, A1, B, B1, B2, B3), mit GST ohne Fragment (GST) sowie ohne Zugabe von Antigen (leer) sind in Abb. 3.1 dargestellt.

Die gemessene Absorption ist dabei ein Maß für die Menge. Man erkennt, dass die Titer gegen fragmentfreie GST sich kaum vom Leerwert unterscheiden. Dies zeigt, dass das verwendete Antiserum keine Antikörper gegen Glutathion-S-Transferase enthielt. Die im verwendeten Serum vorhandenen Antikörper richten sich sowohl gegen die

großen Fragmente A und B als auch gegen die Teilfragmente B1 bis B3, wobei die Titer gegen Fragment B3 (Aminosäuren 237-326) fast genauso hoch waren wie gegen das größere Fragment B (137-326). Die Abweichungen zwischen den jeweiligen Parallelmessungen betrugen bei diesem Experiment im Durchschnitt weniger als 5 %. Gegen das Fusionsprotein A1-GST ließen sich hier und auch in allen weiteren Experimenten keine signifikanten Antikörpertiter nachweisen.

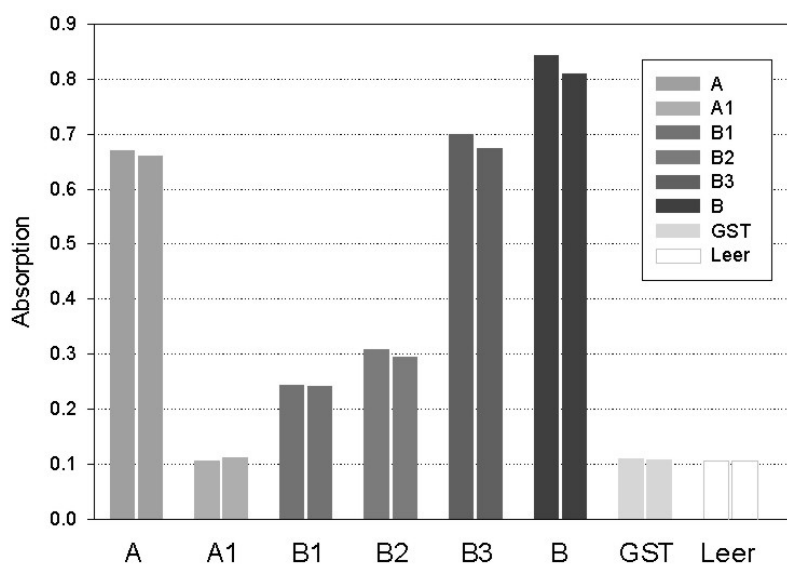


Abb. 3.1 Titer eines käuflichen polyklonalen Kaninchen-Antiserums gegen die einzelnen Asparaginase-Fragmente. GST: Glutathion-S-Transferase ohne inseriertes Fragment, Leer: ohne Zusatz von Antigen. Mit jedem Antigen wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Anwendung des Assays auf Patientenseren ergab vergleichbare Ergebnisse. Als Beispiele sind in Abb. 3.2 drei Seren verschiedener Patienten mit unterschiedlichen Mustern herausgegriffen. Hier sind die mit GST ohne Insert gemessenen Blindwerte bereits von den Messwerten abgezogen. Patient 1 hatte lediglich Antikörper gegen die Frag-

mente B3 und B entwickelt. Bei dem zweiten Patienten waren die Titer gegen alle Fragmente etwa gleich hoch, während sich im dritten Serum vor allem Antikörper gegen die großen Fragmente A und B nachweisen ließen. Diese Ergebnisse deuten bereits an, dass der Assay durchaus eine gewisse Selektivität besitzt, d. h. jedes der untersuchten Seren zeigte ein etwas anderes Antikörper-Muster.

Die normalerweise verwendete Serumverdünnung von 1:100 und ein Probevolumen von 50µl pro well entsprachen einem Volumen von 5 ml an Patientenserum. Die Streuung der mit Patientenseren gewonnenen Daten war etwas höher als bei Verwendung des kommerziellen Kaninchenserums. Sie lag typischerweise bei 10-20%.

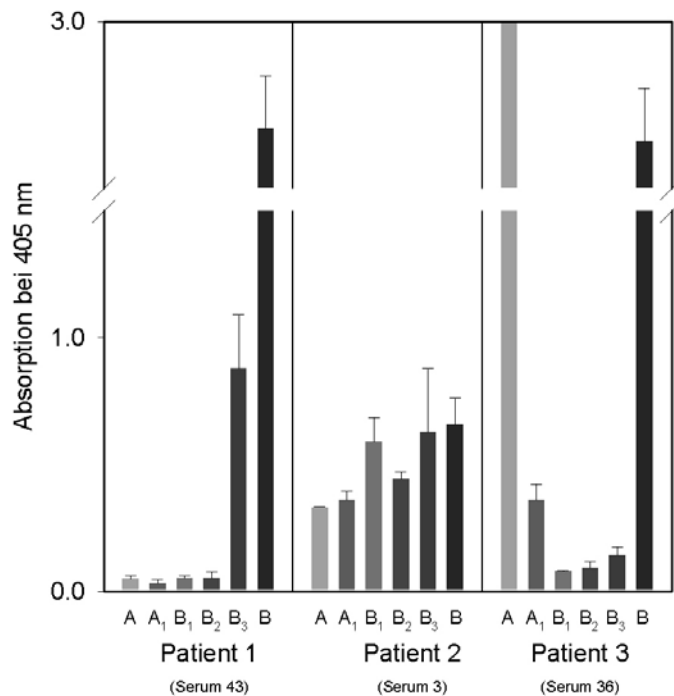


Abb. 3.2 Vergleich der Titer von drei Patientenseren gegen die verschiedenen EcA-GST-Fusionsproteine (GST-Werte schon subtrahiert)

Als weitere Kontrolle wurden zwei verschiedene Präparationen von Fusionsproteinen aus unterschiedlichen Expressionen verglichen. Dies wurde am Beispiel des Fusionsproteins B-GST in Abb. 3.3 dargestellt. Mit allen untersuchten Seren ergab sich etwa dasselbe Verhältnis der Titer gegenüber einer länger gelagerten Antigen-Präparation („alt“) und einer frisch exprimierten und gereinigten Probe („neu“). Das Verhältnis der Titer gegen das „neue“ und das „alte“ Fragment betrug im Durchschnitt 4.3 ± 0.7 .

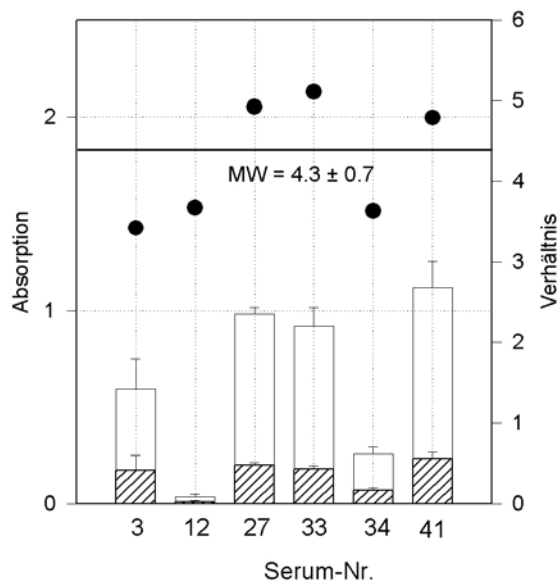


Abb. 3.3 Vergleich der Titer gegen von zwei unabhängig voneinander exprimierten Fusionsproteinen (B-GST)

3.3 Titerbestimmungen mit intakten Asparaginasen als Antigen

Außer der rekombinanten Fusionsproteine mit Fragmenten der *E. coli*-Asparaginase wurden bei einigen Experimenten auch die therapeutisch verwendeten Asparaginase (Asparaginase medac[®], PEG-Asparaginase und Erwinase[®]) in unveränderter Form als Antigene verwendet, ohne dass der Assay dabei modifiziert wurde. In Abb. 3.4 ist für einen Patienten (Code: roc84), bei dem wegen allergischer Nebenwirkungen das Präparat gewechselt wurde, der zeitliche Verlauf der Titer gegen alle drei Enzyme dargestellt. Der Patient war zuvor mit PEG-Asparaginase behandelt worden und erhielt am 20.3.2000 eine Dosis von 20 000 U *Erwinia*-Asparaginase. Unsere retrospektiv erhobenen Daten (Abb. 3.4) zeigen jedoch, dass der Patient zu diesem Zeitpunkt bereits einen beträchtlichen Antikörpertiter gegen Erwinase[®] besaß, während Antikörper gegen Asparaginase medac[®] erst nach

einigen Tagen auftraten. Tatsächlich wurde die verabreichte *Erwinia*-Asparaginase rasch inaktiviert. Da der Patient zuvor noch nie Erwinase[®] erhalten hatte, ist anzunehmen, dass der bereits bestehende Titer gegen das *Erwinia*-Enzym auf einer Kreuzreaktivität mit der *E. coli*-Asparaginase beruht. Das Vorkommen einer derartigen Kreuzreaktivität wurde bereits 1994 von Moola et al. ^[39] beschrieben.

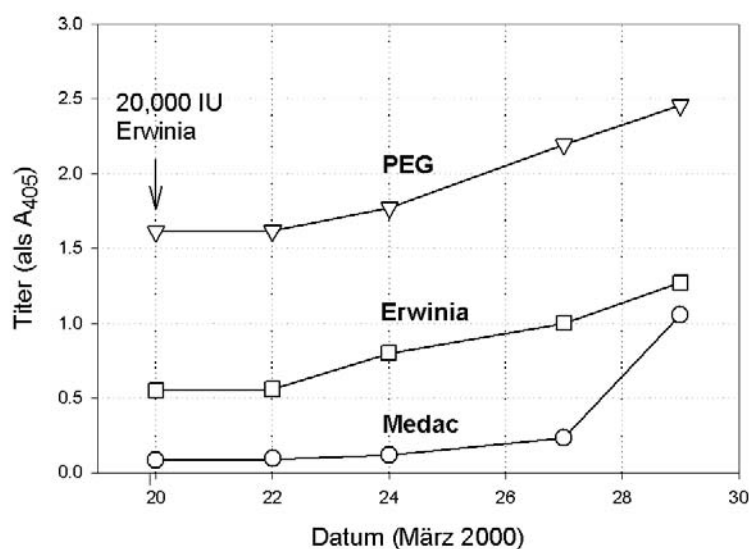


Abb. 3.4 Zeitlicher Verlauf der Titer gegen verschiedene Asparaginasen im Serum eines Patienten (s. Text)

3.4 „Stille Inaktivierung“ und Titer gegen Asparaginasefragmente

Von der in Abschnitt 3.4 beschriebenen Patientengruppe wurden nach der Behandlung mit PEG-Asparaginase nicht nur umfangreiche klinische Daten erhoben, sondern während der ersten Wochen auch ein detailliertes Drug-Monitoring durchgeführt. Deshalb standen für alle Mitglieder der Gruppe Daten zur Verfügung, die die Abnahme der Asparaginase-Aktivität im Serum als Funktion der Zeit widerspiegeln. In einer ganzen Reihe von Fällen zeigte sich eine deutlich oder stark

beschleunigte Abnahme der Volumenaktivität, d. h. es hatte die in der Einleitung beschriebene „stille Inaktivierung“ stattgefunden. Um zu prüfen, ob dieser Antikörper-Assay unter Verwendung rekombinant hergestellter Fusionsproteine Hinweise auf das Auftreten „stiller Inaktivierung“ liefern kann, wurden im Rahmen dieser Arbeit mit allen vorliegenden Serumproben von 33 der 70 Patienten die Titer gegen die sechs zur Verfügung stehenden Fusionsproteine gemessen. Die 33 Patienten wurden zufällig ausgewählt. Aus Zeitgründen war es leider nicht möglich, alle Seren zu untersuchen,

Abb. 3.5 zeigt einige Ergebnisse dieser Messreihe, wobei vier Patienten mit unterschiedlich rascher Inaktivierung ausgewählt wurden. Dargestellt sind jeweils die über den gesamten Zeitraum gemittelten Titer gegen die einzelnen Fusionsproteine und im Inset der zeitliche Verlauf der Serumaktivität, beginnend mit dem Tag der Gabe (Tag 0). Die durch die Aktivitätsdaten gezogenen Linien sind Regressionsgeraden, die verdeutlichen, wie aus den Verläufen die Inaktivierungsraten v_i in $U/(I \text{ Serum} \cdot \text{Tag})$ ermittelt wurden. Zur Berechnung der Regressionsgeraden wurden jeweils die stetig abfallenden Bereiche der Zeitverläufe ausgewählt.

Der bei Patient P3 beobachtete Verlauf ist typisch für die Mehrzahl der Fälle. Unter normalen Bedingungen verschwindet die Asparaginase-Aktivität innerhalb von drei bis vier Wochen wieder aus dem Serum. Da unter den Bedingungen der Studie unmittelbar nach der Gabe des Enzyms Volumenaktivitäten von 1000-1500 U/l erreicht wurden, entspricht ein solcher Verlauf einer Inaktivierungsgeschwindigkeit von 50-70 U/l pro Tag. Im Falle des Patienten P3 war diese Inaktivierungskinetik begleitet von niedrigen Antikörpertitern gegen alle sechs Fusionsproteine. Patient P17 zeigte einen deutlich erhöhte Titer gegen das N-terminale Fragment A, nicht aber gegen die Fragmente der Gruppe B. Die Inaktivierungsgeschwindigkeit war dabei gegenüber P3

nur mäßig erhöht (von 60 auf 100 U/l pro Tag). Im Gegensatz dazu war beim Patienten P7 die Inaktivierung des Enzyms mit etwa 170 U/l pro Tag stark beschleunigt. Sie ging mit deutlich erhöhten Titern gegen alle Fragmente mit Ausnahme von A1 und B1 einher. Einen extremen Fall von „stiller Inaktivierung“ repräsentiert Patient P11. Hier war das verabreichte Enzym schon zwei Tage nach Gabe nicht mehr im Serum nachweisbar. Die Inaktivierungsgeschwindigkeit ließ sich hier nur schätzen, lag aber sicher über 250 U/l pro Tag. Dies korrelierte mit sehr stark und selektiv erhöhten Titern gegen die Fragmente A, B und B3.

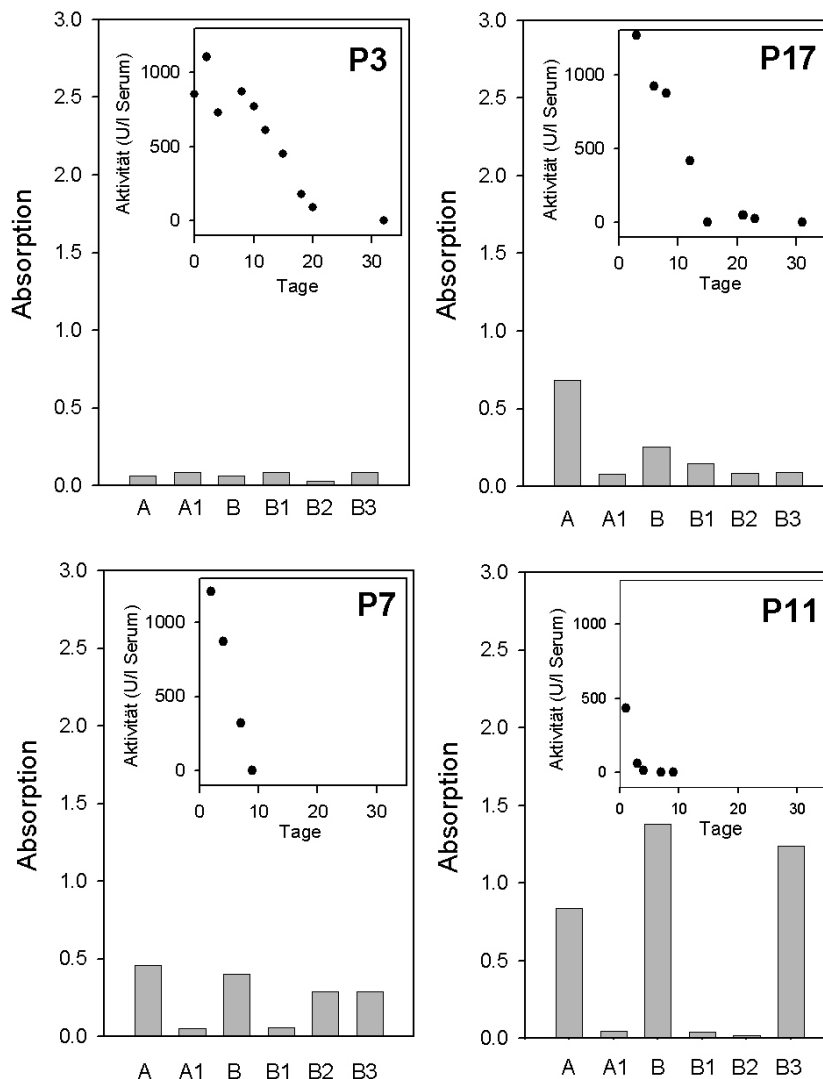


Abb. 3.5 Vergleich der Titer gegen verschiedene Fusionsproteine mit dem zeitlichen Verlauf der Asparaginase-Aktivität im Serum für ausgewählte Patienten mit unterschiedlicher Inaktivierungsgeschwindigkeit. Balken repräsentieren die gemittelten Titer gegen die einzelnen Fusionsproteine, gemittelt über den gesamten Zeitraum; Inset: zeitlicher Verlauf der Serumaktivität mit Regressionsgraden, die die Inaktivierungsraten verdeutlichen. Die Regressionsgraden wurden aus stetig abfallenden Bereichen der Zeitverläufe berechnet.

Die Ergebnisse für alle 33 untersuchten Patienten sind in Abb. 3.6 in Form eines sog. Box-Plots zusammengestellt, der die Häufigkeitsver-

teilung graphisch wiedergibt. Die unteren und oberen Kanten der Boxen entsprechen dem 25. bzw. 75. Perzentil, der Strich innerhalb der Box gibt den Median aller Werte an. Die Fehlerbalken unterhalb und oberhalb der Boxen geben das 10. und 90. Perzentil an. Einzelwerte, die außerhalb dieser Bereiche liegen, sind durch schwarze Kreise einzeln dargestellt.

Man erkennt aus Abb. 3.6, dass bei den untersuchten Seren signifikant erhöhte Titer vor allem gegen die Fusionsproteine mit den beiden großen Fragmenten A und B sowie mit dem C-terminalen Fragment B3 auftraten, während sich bei den Fragmenten A1, B1 und B2 fast alle gemessenen Titer nur geringfügig vom Basiswert unterscheiden. Die wenigen, deutlich erhöhten Werte für diese Antigene erreichen höchstens die normalen Titer gegen A oder B. Die entsprechende Darstellung für die Inaktivierungsgeschwindigkeit v (rechts) zeigt, dass mehr als die Hälfte der untersuchten Patienten normale Zeitverläufe mit Werten zwischen 50 und 70 U/l pro Tag zeigten. Bei etwa einem Drittel der untersuchten Patienten war die Inaktivierung mit Raten über 100 U/l pro Tag signifikant beschleunigt und etwa 10 % zeigten sehr hohe Inaktivierungsraten mit Werten zwischen 150 und 300 U/l Tag.

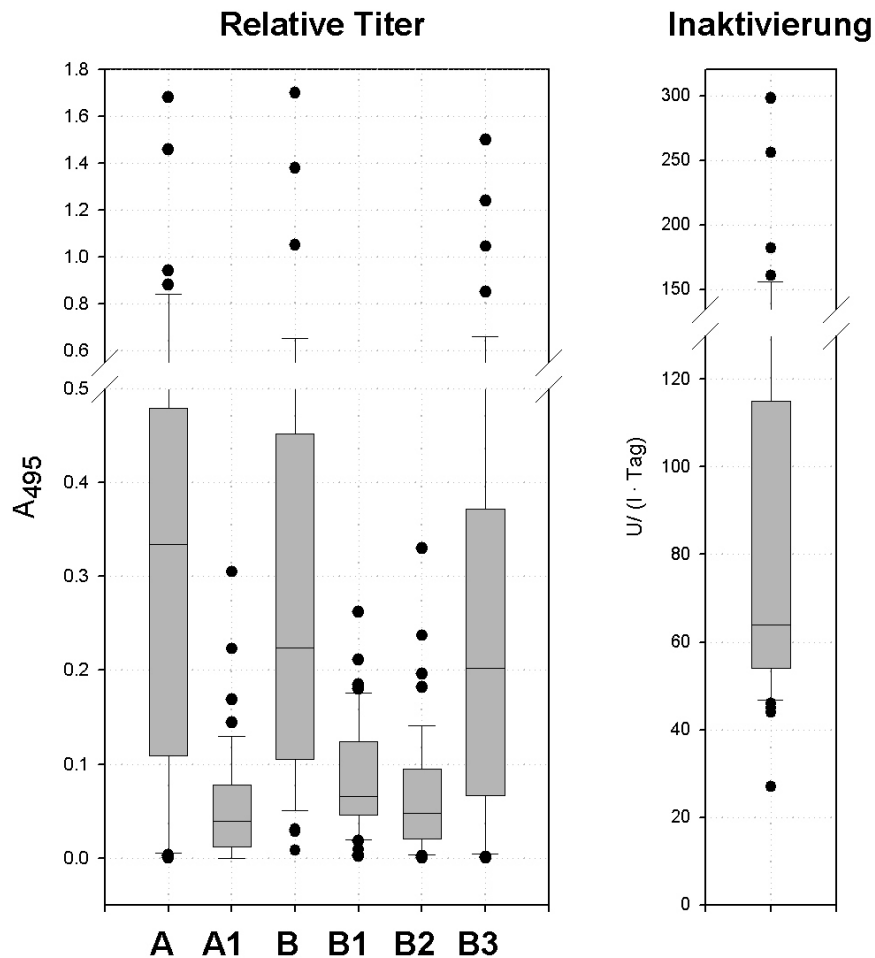


Abb. 3.6 Häufigkeitsverteilung der AK- Titer gegen die einzelnen Asparaginase Fragmente für alle untersuchten Patienten. Die unteren und oberen Kanten der Boxen entsprechen dem 25. bzw. 75. Perzentil, der Strich innerhalb der Box gibt den Median aller Werte an. Die Fehlerbalken unterhalb und oberhalb der Boxen geben das 10. und 90. Perzentil an. Einzelwerte, die außerhalb dieser Bereiche liegen sind durch schwarze Kreise einzeln dargestellt.

Um mögliche Korrelationen zwischen Inaktivierungsgeschwindigkeit und Titern gegen einzelne Asparaginasefragmente darzustellen, sind in Abb. 3.7 die gleichen Daten in anderer Form aufgetragen. Dort sind für jedes der verfügbaren Antigene und für alle Patienten die jeweiligen Inaktivierungsgeschwindigkeiten sowie die entsprechenden Titer zueinander in Beziehung gesetzt. Aus der Abbildung wird deutlich, dass für die stark antigen wirkenden Proteine A, B und A3 extrem hohe Inaktivierungsraten über 150 U/l Tag fast ausnahmslos auch mit ungewöhnlich hohen Antikörpertitern einhergehen. Die entsprechenden Trends sind durch parabolische Fits hervorgehoben. Besonders klar tritt die Tendenz für die Antigene B und B3 hervor.

An dieser Stelle ist jedoch anzumerken, dass für eine detaillierte statistische Analyse die Zahl der Werte, die im Rahmen der Arbeit gesammelt werden konnte, noch zu gering ist. Ob tatsächlich eine signifikante Korrelation zwischen Antikörpertitern und „stiller Inaktivierung“ besteht, kann erst entschieden werden, wenn weitere Patientendaten gesammelt und analysiert worden sind.

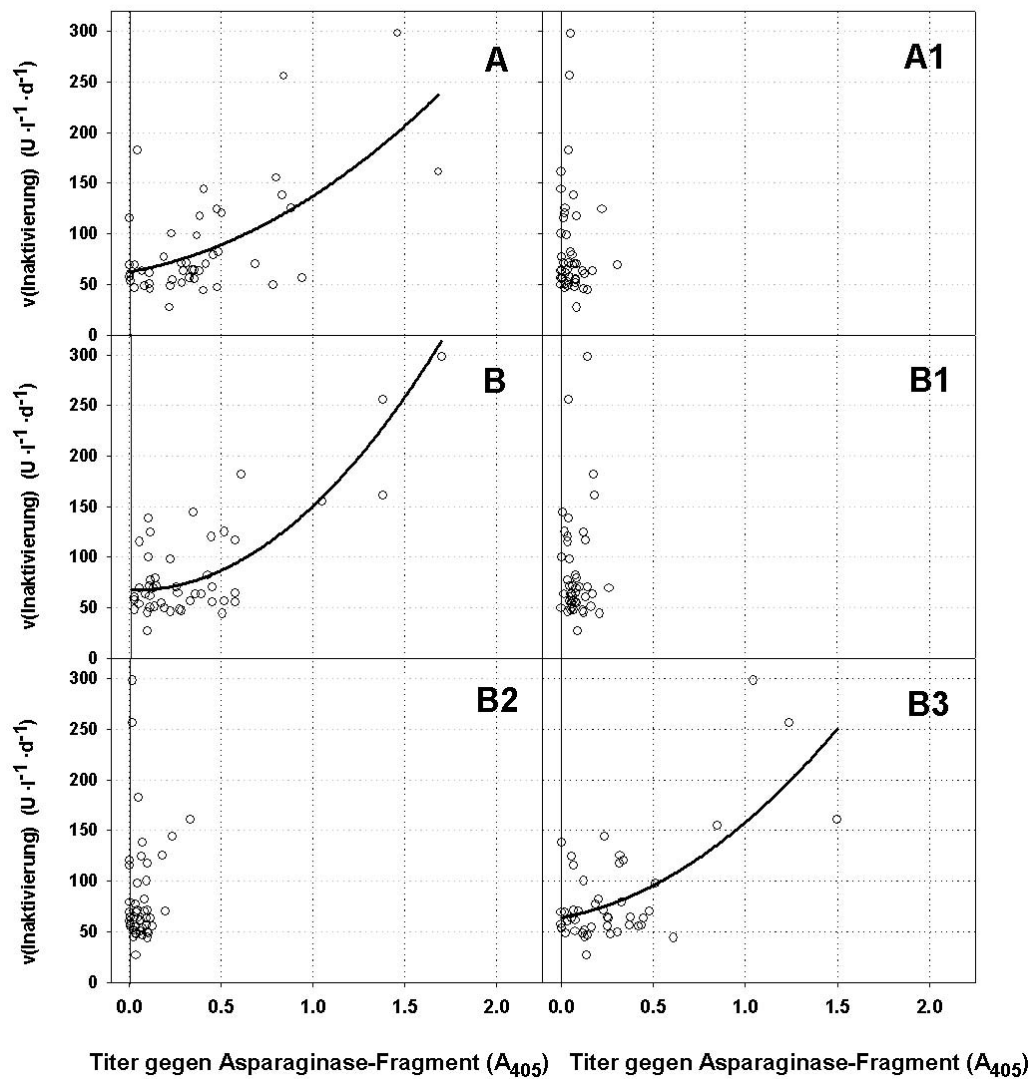


Abb. 3.7 Alternative Darstellung der Daten aus Abbildung 3.6 zur Verdeutlichung der Beziehung der jeweiligen Inaktivierungsgeschwindigkeiten und der entsprechenden Titer für jedes der verfügbaren Antigene für alle Patienten

4 Diskussion

4.1 Rationale für die Entwicklung eines „epitop-spezifischen“ Assays

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurden die bislang eingesetzten Tests zur Bestimmung gebildeter Antikörper gegen Asparaginase mit dem kompletten Asparaginase-Molekül als Antigen durchgeführt ^[60,62]. Die Ergebnisse dieser Ansätze lieferten keine zuverlässigen Hinweise darauf, ob bei einem Patienten eine Inaktivierung des Enzyms zu erwarten war bzw. bereits stattgefunden hatte oder ob bei erneuter Applikation die Gefahr einer Überempfindlichkeitsreaktion bestehen würde. Ein mit diesen herkömmlichen Titerbestimmungen erfasster Antikörperstatus im Serum eines Patienten lieferte deshalb keine prognostische Aussage über den weiteren Verlauf der Behandlung.

Überlegungen, wie eine bessere prognostische Aussagefähigkeit des Tests zu erreichen sei, führten dazu, bei der Suche nach gebildeten anti-Asparaginase-Antikörpern im Serum eines Patienten nicht das intakte Asparaginase-Molekül als Antigen vorzulegen, sondern eine potentielle Immunreaktion auf einzelne Teilstücken zu untersuchen. Dieser Ansatz beruht auf der Tatsache, dass größere Proteine wie die Asparaginase mehrere Epitope, also antikörperbindende Oberflächenbezirke, enthalten. Daher ist zu erwarten, dass Interaktionen der Antikörper mit den Epitopen unterschiedliche Wirkungen haben können, je nachdem wo das betreffende Epitop lokalisiert ist.

4.2 Epitope und Epitop-Mapping

Die spezifische Oberflächenarchitektur biologischer Makromoleküle wird vom Immunsystem genutzt, um körpereigene Moleküle von körperfremden (d. h. „Selbst“ von „Nicht-Selbst“) zu unterscheiden. Bei Epitopen differenziert man grundsätzlich zwischen B- und T-Zell-Epitopen. Bei B-Zell-Epitopen unterscheidet man die „Erkennung“ des Vorhandenseins von löslichen oder gebundenen Antikörpern auf der Oberfläche von B-Lymphozyten (B-Zell-Rezeptoren), deren variable Bereiche im F_{ab} -Teil zu dem entsprechenden Epitop komplementär sind (Paratope) und das Epitop auf dem Antigen deshalb mit hoher Affinität binden. B-Zell-Epitope von Proteinen bestehen aus 5-20 Aminosäuren. Diese Reste können in der Sequenz des Proteins aufeinanderfolgen (lineare oder sequentielle Epitope) oder von verschiedenen Teilen der Peptidkette gebildet werden (diskontinuierliche oder konformative Epitope). Obwohl auf der Oberfläche eines Proteins im Prinzip das Vorhandensein vieler Epitope möglich ist, findet man in der Regel nur eine relativ kleine Zahl „starker“ Epitope. Diese Erscheinung wird als Immundominanz bezeichnet ^[13].

Von B-Zell-Epitopen grundsätzlich verschieden sind die T-Zell-Epitope. Ihre Aufgabe besteht in der Vermittlung der Immunreaktion auf zellulärer Ebene. T-Zell-Epitope bestehen aus Oligopeptiden (8-13 Aminosäuren). Sie werden vom T-Zell-Rezeptor nur erkannt, wenn das Protein sie vorher von Antigen präsentierenden Zellen proteolytisch abgebaut hat und das betreffende Peptid an ein MHC-Protein (Major Histocompatibility Complex) gebunden präsentiert wird. T-Zell-Epitope sind also immer sequentiell.

Mögliche Epitope eines Proteins lassen sich mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit vorhersagen. So müssen B-Zell-Epitope auf der Protein-oberfläche liegen, damit sie für den Antikörper überhaupt zugänglich sind. Eine hohe Antigenität setzt in der Regel auch voraus, dass das

Epitop in einem relativ flexiblen Abschnitt der Peptidkette liegt. Häufig findet man sie deshalb in Peptidschleifen (loops). Auch die Aminosäuresequenz gibt Hinweise auf mögliche Epitope. Sie enthalten sehr oft geladene Reste (Asp, Glu, Arg, Lys) in der Nachbarschaft hydrophober Aminosäuren.

Da die Methoden zur „Epitop-Vorhersage“ nicht sehr zuverlässig sind, ist man darauf angewiesen, Epitope experimentell zu identifizieren. Bei diesem Epitop-Mapping sind verschiedene Ansätze möglich. Am aussagekräftigsten aber auch am aufwendigsten ist die Herstellung monoklonaler Antikörper (Mab) gegen das Zielprotein und die Identifizierung seiner jeweiligen Bindungsstelle auf dem Protein. Lineare Epitope lassen sich auf einfachere Weise identifizieren. So kann man durch Methoden der kombinatorischen Chemie alle möglichen überlappenden Teilpeptide einer bestimmten Länge (z. B. Hexa-, Hepta- oder Dekapeptide) herstellen und sie gegen polyklonale oder monoklonale Antiseren testen. Ein weiterer Ansatz, das so genannte Phage Display, beruht darauf, dass in einem Oberflächenprotein eines Bakteriophagen mit gentechnischen Methoden alle überhaupt möglichen Peptidsequenzen einer gegebenen Länge „präsentiert“ werden. Besitzt man ein Antiserum gegen ein bestimmtes Protein, kann man in mehreren Runden diejenigen Phagen aus der Phagen-Bibliothek anreichern, die mit den darin enthaltenen Antikörpern reagieren. Durch Sequenzierung der DNA der reaktiven Phagen-Klone kann man dann genau ermitteln, welche Peptidsequenz dort präsentiert wird.

Für die *E. coli*-Asparaginase war zum Zeitpunkt, als diese Arbeit durchgeführt wurde, noch kein Epitop-Mapping verfügbar. Solche Daten lagen aber für die Asparaginase aus *Erwinia chrysanthemi* (Erwinase®) bereits vor ^[39]. Die Autoren verwendeten zur Identifizierung von Epitopen Bibliotheken synthetischer Hexapeptide und polyklonale Antikörper sowohl gegen *Erwinia*-Asparaginase als auch gegen *E. coli*-

Asparaginase. Die auf diese Weise im *Erwinia*-Enzym identifizierten Teilsequenzen hoher Antigenität sind in Abb. 4.1 (siehe Anhang) dargestellt. Außerdem sind in diesen Abbildungen ein Alignment der Sequenzen beider Enzyme, die an der Oberfläche liegenden Aminosäurereste und die Position der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Asparaginase-Fragmente gekennzeichnet. Die Zugänglichkeit der Reste wurde mit Hilfe des Programms DSSP^[32] aus den Koordinaten der tetrameren *E. coli*-Asparaginase^[58] berechnet.

Man erkennt in Abb. 4.1 dass die Sequenzen der beiden Enzyme zwar eng verwandt sind aber in vielen Bereichen deutlich voneinander abweichen. Identisch sind insgesamt nur 55% der Reste, in der Nähe des aktiven Zentrums (Reste 80-130) ist die Sequenzähnlichkeit sehr viel höher. Es fällt weiterhin auf, dass die Antiseren, die gegen die beiden Asparaginasen gewonnen wurden, im *Erwinia*-Enzym nur in wenigen Fällen die gleichen Teilsequenzen erkennen. Dies trifft nur für die Reste 26-35 und 197-205 zu. Diese Erkenntnis steht in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen, dass die Kreuzreaktivität zwischen beiden Asparaginasen nicht sehr hoch ist^[41]. Auch das in Abb. 3.4 dargestellte Experiment bestätigt, dass ein- und dasselbe Patientenserum sehr unterschiedliche Antikörpertiter gegen die drei therapeutisch eingesetzten Asparaginasen aufweisen kann.

Bei der Interpretation von Abbildung 4.1 muss berücksichtigt werden, dass die dort eingezeichneten Epitope mit Hilfe einer Peptidbibliothek aus kurzen Hexapeptiden ermittelt wurden. Deshalb konnten konformative Epitope nicht erfasst werden. Außerdem fällt auf, dass einige der gefundenen Epitope in Bereichen des Proteins liegen, die von außen schlecht oder gar nicht zugänglich sind (zu erkennen am Fehlen der Pfeile). Bei diesen Abschnitten handelt es sich wahrscheinlich nicht um echte Epitope. Moola et al.^[39] schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die Teilsequenz 274-284 (in *E. coli*-Nummerierung) das

dominante Epitop der Erwinia-Asparaginase darstellt und zeigten durch gezielte Mutagenese, dass Veränderungen in dieser Region die Antigenität des Enzyms deutlich senken.

4.3 Brauchbarkeit des Assays und der Fragmente

Die Zielsetzung der Arbeit war es herauszufinden, ob sich die von uns eingesetzten Asparaginase-Teilfragmente als Antigene eignen, um eine prognostische Aussage über eine potentielle „stille Inaktivierung“ oder eine allergische Reaktion machen zu können. Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig, dass zu diesem Zweck die Empfindlichkeit des Assays vollkommen ausreichend ist. Die Genauigkeit des Assays ist trotz einer Fehlerquote von 10-20 % akzeptabel, da sowieso nur bei stark erhöhten Titern eine „stille Inaktivierung“ zu erwarten ist. Bei unseren Versuchen ging es weniger um die Ermittlung von Absolutwerten sondern mehr um das Erkennen eines möglicherweise vorhandenen Reaktionsmusters der einzelnen Asparaginase-Teilstücke mit den jeweiligen im Patientenserum enthaltenen Antikörpern.

Die im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Daten sind in mehrfacher Hinsicht ermutigend. Zum einen zeigen sie, dass bei Verwendung von Asparaginase-GST-Fusionsproteinen als Antigen mit den meisten Patientenseren charakteristische Muster für die unterschiedlichen Antigene entstehen. Auch wenn der Assay in der jetzigen Form noch lange nicht als „epitopspezifisch“ angesehen werden kann, sprechen unsere Daten dafür, dass die beobachteten Muster zumindest mit „stiller Inaktivierung“ korrelieren. Vor allem stark erhöhte Titer gegen das relativ kleine Fragment B3 (89 Aminosäuren oder 27% der Gesamtstruktur) gehen in den meisten Fällen mit rascher Inaktivierung des Enzyms einher.

Das Epitop-Mapping der *Erwinia*-Asparaginase (siehe Abb. 4.1) und die Kristallstrukturen der beiden Enzyme geben Hinweise darauf, warum vor allem Antikörper gegen das Fragment B3 zu einer Inaktivierung der Asparaginase führen. In Abb. 4.2. ist die Struktur des Asparaginase-Dimers (bestehend aus den Untereinheiten B und D) in schematischer Form dargestellt. Die aktiven Zentren beider Asparaginasen (zu erkennen an einem rot dargestellten, gebundenen Aspartat) werden während der Katalyse von einer Peptidschleife abgedeckt, die von den Resten 12-27 derselben Untereinheit gebildet wird (orange). Die dem B3-Fragment entsprechenden Teile beider Untereinheiten (Reste 237-326) liegen nebeneinander in der Mitte der Struktur. Für die Untereinheit B ist diese Teilsequenz rosa dargestellt. Das dominante Epitop des *Erwinia*-Enzyms (274-284) bildet eine Schleife (violett), die sehr nah an dem aktiven Zentrum der benachbarten Untereinheit D liegt. Aus der Abbildung geht klar hervor, dass ein Antikörper, der an dieses Epitop bindet, mit hoher Wahrscheinlichkeit das in der Nähe liegende aktive Zentrum und den beweglichen Loop blockiert und damit die Katalyse unterbindet. Auch die Bindung eines Antikörpers an die ersten beiden Epitope der D-Untereinheit (Reste 26-35 D und 47-53 D) dürfte diesen Effekt haben. Wir nehmen deshalb an, dass es diese Bereiche sind, die für die inaktivierende Wirkung des Asparaginase-Fragments A verantwortlich sind. Wie Abb. 4.1 zeigt, liegen diese Epitope noch außerhalb des Fragments A1, gegen das unseren Ergebnissen zufolge auch kaum Antikörper gebildet werden. Das einzige von Moola et al. vorhergesagte Epitop innerhalb von A1 (Reste 86-94) ist für Antikörper gar nicht zugänglich. Diese Reste bilden Teile des aktiven Zentrums und liegen vollständig im Inneren des Proteins.

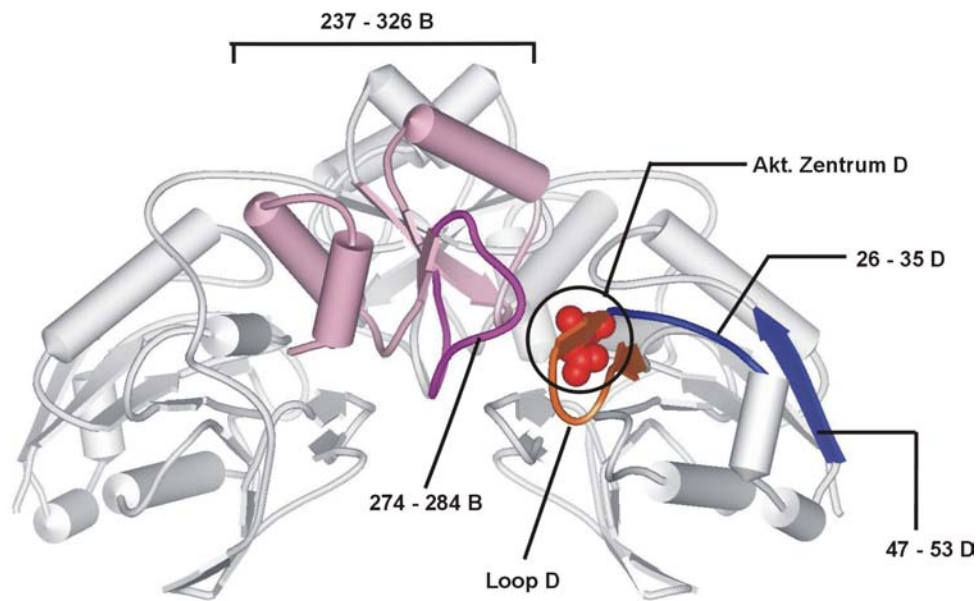


Abb. 4.2 Struktur des Asparaginase-Dimers (bestehend aus den Untereinheiten B und D); die aktiven Zentren beider Asparinasen (siehe rot dargestelltes, gebundenes Aspartat) werden während der Katalyse von einer Peptidschleife abgedeckt, die von den Resten 12-27 derselben Untereinheit gebildet wird (orange); die dem B3-Fragment entsprechenden Teile beider Untereinheiten (Reste 237-326) liegen nebeneinander in der Mitte der Struktur; für die Untereinheit B ist diese Teilsequenz rosa dargestellt. Das dominante Epitop des *Erwinia*-Enzyms (274-284) bildet eine Schleife (violett), die sehr nah an dem aktiven Zentrum der benachbarten Untereinheit D liegt.

Auch wenn unsere Ergebnisse eine viel versprechende Theorie zur Inaktivierung der Asparaginase im Laufe der Therapie liefern, muß dennoch an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Zahl der untersuchten Patienten nicht ausreicht, um eine statistisch signifikante Aussage machen zu können. Andererseits waren unter den erhobenen Daten keine Ausnahmen, die unsere Hypothese widerlegen. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass stets ein Anstieg des Anti-

körpertiters gegen das C-terminale Fragment im Patientenserum in der Regel mit einem vorzeitigen Aktivitätsabfall korreliert. Dies bestätigt die Hypothese, dass ein schneller Abfall der Serumaktivität nach Asparaginase-Applikation auf die Bildung von spezifischen Antikörpern gegen einen definierten Bereich der Asparaginase zurückzuführen ist. Auch wenn unsere Detektion der genannten Epitope eine potentielle Erklärung für die immer wieder beobachtete „stille Inaktivierung“ liefert, ist eine Aussage über mögliche allergische Reaktionen im Rahmen der Asparaginase-Therapie anhand unserer Ergebnisse noch nicht möglich. Um anaphylaktische Zwischenfälle im Laufe der Behandlung mit Asparaginase im Idealfall vorhersagen zu können, müssten antigen-spezifische IgE-Titer gemessen werden.

In diesem Zusammenhang wäre es des Weiteren interessant, den genauen Metabolismus der Asparaginase im Organismus zu erforschen. Es ist noch unbekannt, welchem Abbauweg das Enzym im Körper unterliegt. Möglicherweise handelt es sich um einen enzymatischen Abbau durch Proteasen oder aber um eine Aufnahme in Zellen des retikulo-endothelialen Systems (RES).

4.4 Eignung der zur Verfügung stehenden Patientenseren

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der kritischen Betrachtung der Ergebnisse ist, dass die uns zur Verfügung gestellten Patientenseren nicht nach geeigneten Kriterien gesammelt worden waren. Es wäre für unsere Untersuchungen interessant gewesen, von jedem Patienten eine Serumprobe aus der Zeit vor der ersten Asparaginase-Applikation zur Verfügung gehabt zu haben. So hätte man feststellen können, ob möglicherweise von vornherein vorhandene Antikörper irgendeinen Einfluß auf die weitere Reaktion des Patienten nach Asparaginase-Gabe haben. Studien an freiwilligen Probanden haben gezeigt, dass

bei manchen Menschen Asparaginase-Antikörper im Blut nachzuweisen sind, obgleich nie zuvor ein Kontakt mit diesem Enzym stattgefunden hat. Aus diesem Grund wäre die Erhebung des Antikörperstatus von jedem Patienten vor Beginn der Therapie mit Asparaginase sinnvoll.

Des Weiteren wäre es, um eine präzise Aussage über den Verlauf der Antikörperbildung machen zu können, notwendig, von jedem Patienten Serumproben zur Verfügung zu haben, die alle aus definierten Abständen nach Asparaginase-Applikation stammen. Dabei wäre es ideal, von jedem Patienten Blutproben zu haben, die täglich zur gleichen Stunde bis zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms gewonnen werden.

Darüber hinaus wäre es für unsere Untersuchungen wünschenswert gewesen, Seren von Patienten untersuchen zu können, die unter Asparaginase-Behandlung eine Überempfindlichkeitsreaktion gezeigt hatten. Leider standen uns nur einige wenige Proben von Patienten mit anaphylaktischem Schock nach Asparaginase-Gabe zur Verfügung. Bei diesen Patienten waren sehr gleichmäßig verteilte, mittlere Antikörpertiter gegen die einzelnen Fragmente auffällig. Auf Grund der jedoch zu geringen Anzahl als auch wegen der sehr rudimentären Daten zu jenen Patienten, sind diese Ergebnisse hier nicht explizit aufgeführt. Dennoch wäre es sehr interessant, der Frage nachzugehen, ob möglicherweise auch für die „Allergiker“ ein charakteristisches Antikörper-Muster existiert, so wie es bei den „schnellen Inaktivieren“ der Fall ist.

4.5 Klinische Relevanz

Da unsere Untersuchungen mit eindeutigem klinischen Interesse durchgeführt wurden, stellt sich nun an dieser Stelle die Frage, in wie-

weit unsere bisherigen Erkenntnisse bereits sinnvoll angewendet werden können. Wie bereits beschrieben, scheint sich unsere Hypothese hinsichtlich des Vorhandenseins von Epitopen, die für die „stille Inaktivierung“ verantwortlich sind, zu bestätigen.

Dies kann als ein Fortschritt bei der Entwicklung einer Methode zur rechtzeitigen Detektion von „stillen Inaktivierern“ angesehen werden. Durch den erfolgreichen erstmaligen Einsatz von Asparaginase-Fragmenten ist es gelungen, im Gegensatz zu dem Assay mit dem kompletten Asparaginase-Molekül, hinsichtlich der „stillen Inaktivierung“ eine relevante prognostische Vorhersage für den weiteren Behandlungsverlauf zu machen. Wie bereits erwähnt, müssen für eine statistisch signifikante Aussage jedoch noch weitere Patientenseren getestet werden, die gegebenenfalls auch nach den oben beschriebenen Kriterien gesammelt werden, um ein einheitliches und damit vergleichbares Kollektiv darzustellen. Der beschriebene Versuchsansatz, d.h. der von uns eingesetzte Assay mit den entsprechenden Fragmenten, ist in dieser Form durchaus verwertbar, um ein bestimmtes, für die „stille Inaktivierung“ verantwortliches Antikörpermuster zu erkennen. Dennoch wäre nach genauer Kenntnis der Epitop-Lokalisation eine selektivere Gestaltung der Fragmente sinnvoll.

Eine prognostische Aussage hinsichtlich einer potentiellen allergischen Reaktion hingegen, kann allein mit der Durchführung dieses Assays nicht getroffen werden. Wie bereits erwähnt, müsste eine zusätzliche Messung der IgE-Antikörper-Titer erfolgen.

4.6 Weiterentwicklung des „epitopspezifischen“ Assays

Doch nicht nur die mit den Testseren zusammenhängenden Kriterien müssten verbessert werden, auch der Assay an sich kann noch optimiert werden. Ausgehend von dem Bestreben, einen epitopspezifischen Assay zu gestalten, müsste im nächsten Schritt ein Epitop-mapping durchgeführt werden. In unserem Ansatz wurden die Fragmente ohne die Kenntnis der genauen Lage der Epitope, also relativ ungezielt, hergestellt. Durch ein genaues Epitope-Mapping, könnten noch selektivere Fragmente erzeugt werden.

5 Zusammenfassung

L-Asparaginase ist ein bakterielles Enzym, das seit über 30 Jahren im Rahmen einer Polychemotherapie zur Behandlung akuter lymphatischer Leukämien und einiger maligner Lymphome eingesetzt wird. Asparaginase katalysiert die Hydrolyse von L-Asparagin und bewirkt auf diese Weise eine Depletion des Asparaginspiegels im Plasma. Dadurch wird die Konzentration der für die Tumorzellen essentiellen Aminosäure so gering gehalten, so dass eine weitere Replikation der malignen Zellen nicht mehr möglich ist.

Erhebliche Komplikationen im Rahmen der Behandlung mit Asparaginase stellen zum einen die unterschiedlich ausgeprägten Überempfindlichkeitsreaktionen und zum anderen die stumme Inaktivierung des Enzyms dar. Durch eine Vorhersage einer möglichen allergischen Reaktion bzw. durch die Möglichkeit, eine vorzeitige Inaktivierung des Enzyms zu erkennen, könnte eine deutliche Verbesserung des Therapieerfolges erzielt werden.

Der bisher in der Klinik eingesetzte immunologische Test zum Nachweis von gebildeten Antikörpern, die möglicherweise für eine Überempfindlichkeitsreaktion bzw. für die Inaktivierung des Enzyms verantwortlich sind, ist auf Grund zu geringer Sensitivität und Spezifität prognostisch nicht verwertbar.

Von der Hypothese ausgehend, dass es sich bei der Antikörperbildung um epitopspezifische Antikörper handelt, wurden zunächst, ohne Kenntnisse über die genaue Lokalisation der Epitope, durch Restriktionsverdau fünf Asparaginasefragmente erzeugt. Der Einsatz dieser Fragmente mit bekannter Aminosäuresequenz als Antigen führte zu der Erkenntnis, dass bei Patienten, bei denen eine vorzeitige Inaktivierung des Enzyms im Serum festgestellt worden war, eine

bestimmte Antikörperpopulation, nämlich gegen das C-terminale Fragment (237-326), gebildet wird. Eine eindeutige Korrelation zwischen Antikörpertitern gegen eines der anderen Fragmente und einer „schnellen Inaktivierung“, konnte nicht festgestellt werden.

Diese Ergebnisse liefern eine viel versprechende Grundlage für die Weiterentwicklung des Assays durch genaues Epitop-Mapping, so dass die für immunologische Tests eingesetzten Fragmente in Zukunft noch selektiver gestaltet werden können. Um statistisch signifikante Aussagen machen zu können, sind noch weitere Tests an explizit für diese Fragestellung gesammelten Serumproben notwendig.

6 Literaturverzeichnis

- [1] E. Ahlke, U. Nowak-Gottl, P. Schulze-Westhoff, G. Werber, H. Borste, G. Wurthwein, H. Jurgens and J. Boos (1997) Dose reduction of asparaginase under pharmacokinetic and pharmacodynamic control during induction therapy in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, **96**, 675-681.
- [2] B. K. Albertsen, H. Schroder, P. Jakobsen, V. I. Avramis, H. J. Muller, K. Schmiegelow and N. T. Carlsen (2002) Antibody formation during intravenous and intramuscular therapy with Erwinia asparaginase. *Med Pediatr Oncol*, **38**, 310-316.
- [3] I. M. Appel, J. P. Pinheiro, M. L. den Boer, C. Lanvers, N. C. Reniers, J. Boos and R. Pieters (2003) Lack of asparagine depletion in the cerebrospinal fluid after one intravenous dose of PEG-asparaginase: a window study at initial diagnosis of childhood ALL. *Leukemia*, **17**, 2254-2256.
- [4] B. L. Asselin (1999) The three asparaginases. Comparative pharmacology and optimal use in childhood leukemia. *Adv Exp Med Biol*, **457:621-9.**, 621-629.
- [5] B. L. Asselin, J. C. Whitin, D. J. Coppola, I. P. Rupp, S. E. Sallan and H. J. Cohen (1993) Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. *J Clin Oncol*, **11**, 1780-1786.
- [6] F. F. Becker and J. D. Broome (1969) L-asparaginase: inhibition of endogenous RNA polymerase activity in regenerating liver. *Arch.Biochem.Biophys.*, **130**, 332-336.
- [7] J. Boos (1997) Pharmacokinetics and drug monitoring of L-asparaginase treatment. *Int.J Clin Pharmacol.Ther.*, **35**, 96-98.
- [8] J. Boos, G. Werber, E. Ahlke, P. Schulze-Westhoff, U. Nowak-Gottl, G. Wurthwein, E. J. Verspohl, J. Ritter and H. Jurgens (1996) Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations. *Eur.J Cancer*, **32A**, 1544-1550.
- [9] D. Borek and M. Jaskolski (2001) Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Biochim.Pol.*, **48**, 893-902.

- [10] J. D. Broome (1961) Evidence that the L- asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *Nature*, **191**, 1114-1115.
- [11] J. D. Broome (1968) Factors which may influence the effectiveness of L-asparaginases as tumor inhibitors. *Br.J.Cancer*, **22**, 595-602.
- [12] J. D. Broome (1970) L-asparaginase: early findings and current studies on the metabolism of L-asparagine in lymphoma cells. *Recent Results Cancer Res.*, **33:15-21.**, 15-21.
- [13] Bruce Alberts, Dennis Bray, and Julian Lewis Martin Raff, Keith Roberts James D. Watson. Molekularbiologie der Zelle. 3. Auflage, 1421. 1995. Weinheim, Lothar Jaenicke, VCH.
- [14] P. W. Buck, R. Elsworth, G. A. Miller, K. Sargeant, J. L. Stanley and H. E. Wade (1971) The batch production of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. *J Gen.Microbiol.*, **65**, i.
- [15] O. Bussolati, S. Belletti, J. Uggeri, R. Gatti, G. Orlandini, V. Dall'Asta and G. C. Gazzola (1995) Characterization of apoptotic phenomena induced by treatment with L-asparaginase in NIH3T3 cells. *Exp Cell Res.*, **220**, 283-291.
- [16] H. A. Campbell and L. T. Mashburn (1969) L-Asparaginase EC-2 from *Escherichia coli*. Some substrate specificity characteristics. *Biochemistry*, **8**, 3768-3775.
- [17] H. A. Campbell, L. T. Mashburn, E. A. Boyse and L. J. Old (1967) Two L-asparaginases from *Escherichia coli* B. Their separation, purification, and antitumor activity. *Biochemistry*, **6**, 721-730.
- [18] R. L. Capizzi, J. R. Bertino, R. T. Skeel, W. A. Creasey, R. Zanes, C. Olayon, R. G. Peterson and R. E. Handschumacher (1971) L-asparaginase: clinical, biochemical, pharmacological, and immunological studies. *Ann.Intern.Med*, **74**, 893-901.
- [19] N. K. Cheung, I. Y. Chau and P. F. Coccia (1986) Antibody response to *Escherichia coli* L-asparaginase. Prognostic significance and clinical utility of antibody measurement. *Am.J Pediatr Hematol.Oncol*, **8**, 99-104.
- [20] Y. F. Cheung, C. W. Lee, C. F. Chan, K. L. Chan, Y. L. Lau and C. Y. Yeung (1994) Somatostatin therapy in L-asparaginase-induced pancreatitis. *Med Pediatr Oncol*, **22**, 421-424.
- [21] B. D. Clarkson, M. D. Dowling, T. S. Gee, I. B. Cunningham and J. H. Burchenal (1975) Treatment of acute leukemia in adults. *Cancer*, **36**, 775-795.

- [22] C. T. Dellinger and T. D. Miale (1976) Comparison of anaphylactic reactions to asparaginase derived from *Escherichia coli* and from *Erwinia* cultures. *Cancer*, **38**, 1843-1846.
- [23] J. A. Distasio, R. A. Niederman, D. Kafkewitz and D. Goodman (1976) Purification and characterization of L-asparaginase with anti-lymphoma activity from *Vibrio succinogenes*. *J Biol Chem*, **251**, 6929-6933.
- [24] J. A. Distasio, A. M. Salazar, M. Nadji and D. L. Durden (1982) Glutaminase-free asparaginase from *vibrio succinogenes*: an antilymphoma enzyme lacking hepatotoxicity. *Int.J Cancer*, **30**, 343-347.
- [25] M. Duval, S. Suciu, A. Ferster, X. Rialland, B. Nelken, P. Lutz, Y. Benoit, A. Robert, A. M. Manel, E. Vilmer, J. Otten and N. Philippe (2002) Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood*, **99**, 2734-2739.
- [26] I. J. Ertel, M. E. Nesbit, D. Hammond, J. Weiner and H. Sather (1979) Effective dose of L-asparaginase for induction of remission in previously treated children with acute lymphocytic leukemia: a report from Childrens Cancer Study Group. *Cancer Res.*, **39**, 3893-3896.
- [27] M. P. Gallagher, R. D. Marshall and R. Wilson (1989) Asparaginase as a drug for treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Essays Biochem.*, **24:1-40.**, 1-40.
- [28] D. H. Ho, H. Y. Yap, N. Brown, R. S. Benjamin, E. J. Friereich, G. R. Blumenschein and G. P. Bodey (1981) Clinical pharmacology of intramuscularly administered L-asparaginase. *J Clin Pharmacol.*, **21**, 72-78.
- [29] P. P. Ho, E. B. Milikin, J. L. Bobbitt, E. L. Grinnan, P. J. Burck, B. H. Frank, L. D. Boeck and R. W. Squires (1970) Crystalline L-asparaginase from *Escherichia coli* B. I. Purification and chemical characterization. *J Biol Chem*, **245**, 3708-3715.
- [30] N. Jaffe, D. Traggis, L. Das, W. C. Moloney, H. W. Hann, B. S. Kim and R. Nair (1971) L-asparaginase in the treatment of neoplastic diseases in children. *Cancer Res.*, **31**, 942-949.

- [31] B. Jones, J. F. Holland, O. Glidewell, C. Jacquillat, M. Weil, C. Pochedly, L. Sinks, L. Chevalier, H. M. Maurer, K. Koch, G. Falkson, R. Patterson, B. Seligman, J. Sartorius, F. Kung, F. Haurani, M. Stuart, E. O. Burgert, F. Ruymann, A. Sawitsky, E. Forman, H. Pluess, J. Truman and N. Hakami (1977) Optimal use of L-asparaginase (NSC-109229) in acute lymphocytic leukemia. *Med Pediatr Oncol*, **3**, 387-400.
- [32] W. Kabsch and C. Sander (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **22**, 2577-2637.
- [33] J. G. KIDD (1953) Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. *J Exp Med*, **98**, 565-582.
- [34] D. Killander, A. Dohlwitz, L. Engstedt, S. Franzen, G. Gahrton, B. Gullbring, G. Holm, A. Holmgren, S. Hoglund, A. Killander, D. Lockner, H. Mellstedt, P. J. Moe, J. Palmblad, P. Reizenstein, K. O. Skarberg, B. Swedberg, A. M. Uden, B. Wadman, L. Wide and L. Ahstrom (1976) Hypersensitive reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia. *Cancer*, **37**, 220-228.
- [35] D. Korholz, R. Urbanek, W. Nurnberger, A. Jobke, U. Gobel and V. Wahn (1987) Formation of specific IgG antibodies in L-asparaginase treatment. Distribution of IgG subclasses. *Monatsschr.Kinderheilkd.*, **135**, 325-328.
- [36] L. T. Mashburn and J. C. WRISTON, Jr. (1964) Tumor inhibitor effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. *Arch.Biochem.Biophys.*, **105:450-2.**, 450-452.
- [37] G. Mathe, J. L. Amiel, A. Clarysse, M. Hayat and L. Schwarzenberg (1970) The place of the L-asparaginase in the treatment of acute leukemias. *Recent Results Cancer Res.*, **33:278-87.**, 278-287.
- [38] H. K. Miller, I. H. Krakoff, J. S. Salser and M. E. Balis (1970) Sensitivity to L-asparaginase and amino acid metabolism. *J Natl.Cancer Inst.*, **44**, 1129-1139.
- [39] Z. B. Moola, M. D. Scawen, T. Atkinson and D. J. Nicholls (1994) *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. *Biochem.J*, **302**, 921-927.

- [40] H. J. Muller, R. Beier, J. C. da Palma, C. Lanvers, E. Ahlke, S. von, V, M. Gunkel, A. Horn, M. Schrappe, G. Henze, K. Kranz and J. Boos (2002) PEG-asparaginase (Oncaspar) 2500 U/m² BSA in reinduction and relapse treatment in the ALL/NHL-BFM protocols. *Cancer Chemother.Pharmacol.*, 149-154.
- [41] H. J. Muller and J. Boos (1998) Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev.Oncol Hematol.*, **28**, 97-113.
- [42] H. J. Muller, L. Loning, A. Horn, D. Schwabe, M. Gunkel, M. Schrappe, S. von, V, G. Henze, d. P. Casimiro, J. Ritter, J. P. Pinheiro, M. Winkelhorst and J. Boos (2000) Pegylated asparaginase (Oncaspar) in children with ALL: drug monitoring in reinduction according to the ALL/NHL-BFM 95 protocols. *Br J Haematol*, 379-384.
- [43] E. Nagura, K. Kimura, K. Yamada, K. Ota, T. Maekawa, F. Takaku, H. Uchino, T. Masaoka, I. Amaki, K. Kawashima and . (1994) Nation-wide randomized comparative study of doxorubicin, vincristine and prednisolone combination therapy with and without L-asparaginase for adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother.Pharmacol.*, **33**, 359-365.
- [44] U. Nowak-Gottl, E. Ahlke, K. Klosel, H. Jurgens and J. Boos (1997) Changes in coagulation and fibrinolysis in childhood acute lymphoblastic leukaemia re-induction therapy using three different asparaginase preparations. *Eur.J Pediatr*, **156**, 848-850.
- [45] U. Nowak-Gottl, N. Kuhn, J. E. Wolff, J. Boos, B. Kehrel, B. Rath and H. Jurgens (1996) Inhibition of hypercoagulation by antithrombin substitution in E. coli L-asparaginase-treated children. *Eur.J Haematol*, **56**, 35-38.
- [46] T. Ohnuma, J. F. Holland, A. Freeman and L. F. Sinks (1970) Biochemical and pharmacological studies with asparaginase in man. *Cancer Res.*, **30**, 2297-2305.
- [47] T. Ohnuma, J. F. Holland, G. Nagel and G. S. Arneault (1969) Effects of L-asparaginase in acute myelocytic leukemia. *JAMA*, **210**, 1919-1921.
- [48] J. A. Ortega, M. E. Nesbit, Jr., M. H. Donaldson, R. E. Hittle, J. Weiner, M. Karon and D. Hammond (1977) L-Asparaginase, vincristine, and prednisone for induction of first remission in acute lymphocytic leukemia. *Cancer Res.*, **37**, 535-540.

- [49] E. H. Panosyan, R. S. Grigoryan, I. A. Avramis, N. L. Seibel, P. S. Gaynon, S. E. Siegel, H. J. Fingert and V. I. Avramis (2004) Deamination of glutamine is a prerequisite for optimal asparagine deamination by asparaginases in vivo (CCG-1961). *Anticancer Res.*, **24**, 1121-1125.
- [50] C. B. Pratt, J. V. Simone, P. Zee, R. J. Aur and W. W. Johnson (1970) Comparison of daily versus weekly L-asparaginase for the treatment of childhood acute leukemia. *J Pediatr*, **77**, 474-483.
- [51] G. Reaman, P. Zeltzer, W. A. Bleyer, B. Amendola, C. Level, H. Sather and D. Hammond (1985) Acute lymphoblastic leukemia in infants less than one year of age: a cumulative experience of the Children's Cancer Study Group. *J Clin Oncol*, **3**, 1513-1521.
- [52] A. Reiter, M. Schrappe, E. Yakisan, S. Sauter, W. Ebell, M. Zimmermann, W. Hartmann, B. Kremens, N. Kuhn, A. Claviez and . (1994) +AFs-NHL-BFM 90 therapy study in treatment of malignant non-Hodgkin's lymphoma in children and adolescents. Part 3: An intermediate term analysis of the B-NHL/B-ALL+AF0-. *Klin.Padiatr.*, 242-252.
- [53] R. Riccardi, J. S. Holcenberg, D. L. Glaubiger, J. H. Wood and D. G. Poplack (1981) L-asparaginase pharmacokinetics and asparagine levels in cerebrospinal fluid of rhesus monkeys and humans. *Cancer Res.*, 4554-4558.
- [54] M. Schrappe, A. Reiter, S. Sauter, W. D. Ludwig, B. Wormann, J. Harbott, C. Bender-Gotze, W. Dorffel, R. Dopfer, E. Frey and . (1994) +AFs-Concept and interim result of the ALL-BFM 90 therapy study in treatment of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: the significance of initial therapy response in blood and bone marrow+AF0-. *Klin.Padiatr.*, 208-221.
- [55] M. K. Schwartz, E. D. Lash, H. F. Oettgen and F. A. Tomato (1970) L-asparaginase activity in plasma and other biological fluids. *Cancer*, **25**, 244-252.
- [56] L. H. SOBIN and J. G. KIDD (1965) A metabolic difference between two lines of lymphoma 6C3HED cells in relation to asparaginase. *Proc.Soc.Exp Biol Med*, **119:325-7.**, 325-327.
- [57] W. W. Sutow, F. Garcia, K. A. Starling, T. E. Williams, D. M. Lane and E. A. Gehan (1971) L-asparaginase therapy in children with advanced leukemia. The Southwest Cancer Chemotherapy Study Group. *Cancer*, **28**, 819-824.
- [58] A. L. Swain, M. Jaskolski, D. Housset, J. K. Rao and A. Wlodawer (1993) Crystal structure of Escherichia coli L-asparaginase, an

enzyme used in cancer therapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **90**, 1474-1478.

- [59] L. Tallal, C. Tan, H. Oettgen, N. Wollner, M. McCarthy, L. Helson, J. Burchenal, D. Karnofsky and M. L. Murphy (1970) E. coli L-asparaginase in the treatment of leukemia and solid tumors in 131 children. *Cancer*, **25**, 306-320.
- [60] B. Wang, L. J. Hak, M. V. Relling, C. H. Pui, M. H. Woo and M. C. Storm (2000) ELISA to evaluate plasma anti-asparaginase IgG concentrations in patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Immunol.Methods*, **239**, 75-83.
- [61] H. A. Whelan and J. C. WRISTON, Jr. (1969) Purification and properties of asparaginase from escherichia coli B. *Biochemistry*, **8**, 2386-2393.
- [62] M. H. Woo, L. J. Hak, M. C. Storm, W. E. Evans, J. T. Sandlund, G. K. Rivera, B. Wang, C. H. Pui and M. V. Relling (1998) Anti-asparaginase antibodies following E. coli asparaginase therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **12**, 1527-1533.
- [63] C. M. Zwaan, G. J. Kaspers, R. Pieters, N. L. Ramakers-Van Woerden, M. L. den Boer, R. Wunsche, M. M. Rottier, K. Hahlen, E. R. van Wering, G. E. Janka-Schaub, U. Creutzig and A. J. Veerman (2000) Cellular drug resistance profiles in childhood acute myeloid leukemia: differences between FAB types and comparison with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **96**, 2879-2886.

7 Anhang

Lebenslauf

Schulbildung

1984-1987	Grundschule in Herkenrath
1987-1997	Gymnasium in Herkenrath und Allenbach

Hochschulausbildung

11/1997	Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes
1997-2003	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
09/1999	Physikum
08/2000	1. Staatsexamen
09/2002	2. Staatsexamen
11/2003	3. Staatsexamen
1999-2003	Dissertation, Fachbereich Biochemie Thema: „Entwicklung eines Antikörper-Assays zur Risikoabschätzung anaphylaktischer Reaktionen sowie der Inaktivierungswahrscheinlichkeit des Enzyms L- Asparaginase in der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie“

Famulaturen

09/1999-10/1999	Dr. Hebrock, Allgemeinarztpraxis und Praxis für Gynäkologie, Müsen
02/2000-03/2000	Prof. Dr. C. Pierrot- Deseilligny Hôpital de la Salpêtrière, Service de neurologie, Paris
08/2001-10/2001	Prof. Dr. Saeed A. Bajwa, State University of New York, Service of Neurosurgery, Binghamton, N.Y.

Praktisches Jahr

10/2002-02/2003	Prof. Dr. S. Schug, Department of Anaesthesia, Royal Perth Hospital, Perth, Australien
02/2003-06/2003	Prof. Dr. Gotzen/Prof. Dr. Rothmund, Unfallchirurgie/Allgemeinchirurgie, Philipps-Universität Marburg
06/2003-09/2003	Prof. Dr. Maisch, Innere Medizin (Kardiologie), Philipps-Universität Marburg

11/2003	Erteilung der Erlaubnis für die Tätigkeit als Ärztin im Praktikum
01/2004	Beginn der AiP-Tätigkeit im Neurologischen Institut der Goethe-Universität Frankfurt
10/2004	Erhalt der endgültigen Approbation

Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Baum, Czubayko, Daut, Geus, Gotzen, Hellinger, Hesse, Hofmann, Kern, Klenk, Lammel, Lang, Löffler, Maisch, Moll, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Röhm, Remschmidt, Rothmund, Seyberth, Vohland, Weihe, Werner.

Danksagung

Danken möchte ich in erster Linie Herrn Prof. Dr. K.- H. Röhm für die Überlassung der Arbeit.

Herrn Dr. Stefan Schleper danke ich herzlich für die Betreuung, die er mir während der Entstehung der Arbeit zukommen ließ.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Boos sowie Herrn Dr. Hans-Joachim Müller für die wissenschaftliche Kooperation.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ulrich Boudriot für seine Geduld bei der Durchsicht und der Formatierung meiner Arbeit.

Ohne die Unterstützung meiner Eltern wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ihnen gebührt mein besonders herzlicher Dank.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Entwicklung eines Antikörper- Assays zur Risikoabschätzung anaphylaktischer Reaktionen sowie der Inaktivierungswahrscheinlichkeit des Enzyms L- Asparaginase in der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie“ in dem Institut für Physikalische Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. K.- H. Röhm mit Unterstützung durch Herrn Dr. Schleper und Herrn Dr. Ulrich Boudriot ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt, den 18. 10. 2004